

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences, Technologie
Unité Inserm U618 : « Protéases et Vectorisation pulmonaires »

THÈSE présentée par :
Kévin BARANGER

soutenue le : **15 Décembre 2008**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université François Rabelais**

Discipline/ Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

**DÉVELOPPEMENT D'UNE STRATÉGIE
THÉRAPEUTIQUE ANTI-INFLAMMATOIRE
EN PATHOLOGIE PULMONAIRE BASÉE SUR
L'ADMINISTRATION D'ANTI-PROTÉASES**

THÈSE dirigée par :

M. MOREAU Thierry

Professeur, Université François Rabelais, Tours

Co-Encadrement par :

Melle ZANI Marie-Louise

Maître de Conférences, Université François Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :

Mme QUESNIAUX Valérie

Directrice de Recherche, CNRS, Orléans

M. LEBARGY François

Professeur, Université de Reims

JURY :

M. ANDRES Christian

Professeur, Université François Rabelais, Tours

M. GAUTHIER Francis

Professeur, Université François Rabelais, Tours

M. LEBARGY François

Professeur, Université de Reims

M. MOREAU Thierry

Professeur, Université François Rabelais, Tours

M. PIDARD Dominique

Chargé de Recherche, HDR, CNRS, Paris

Mme QUESNIAUX Valérie

Directrice de Recherche, CNRS, Orléans

REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué au sein de l'unité Inserm U618 « Protéases et Vectorisation Pulmonaires » dirigée par le Professeur Francis Gauthier. Il a pu être réalisé grâce à une allocation de recherche co-financée par la Région Centre et l'Inserm.

Je tiens à remercier le Professeur Thierry MOREAU pour avoir encadré ma thèse pendant ces trois ans. Merci pour ton encadrement scientifique, ta rigueur et pour mon apprentissage de quelques mots de français. Merci pour avoir tenté ta chance avec un mec de l'Ile de Ré mais maintenant la team Moreau est devenue « La Mafia Rochelaise »...Thierry, je te remercie pour tout.

Je voudrais exprimer mes plus sincères remerciements aux membres de mon jury :

- Mme Valérie QUESNIAUX, Directrice de Recherche CNRS, et le Professeur François LEBARGY qui m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail.

- M. Dominique PIDARD, Chargé de Recherche CNRS, et le Professeur Christian ANDRES pour avoir accepté de juger ce travail.

- Le Professeur Francis GAUTHIER pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je tiens à remercier les autres membres de la team Moreau.

Marie-Louise ZANI, pour avoir co-encadré ma thèse. Merci pour ta rigueur, ton organisation, tes blagues et surtout merci d'avoir supporté mon « ZAR-PA » pendant ces trois ans. Merci pour tout.

Sandrine DALLET-CHOISY, pour ton humour et toutes nos discussions... Merci.

Je tiens à remercier tous les membres de l'unité U618, en particulier tous ceux du bâtiment 47C qui ont rendu ces trois ans si agréables. J'espère n'oublier personne...

Sylvie ATTUCCI, Martine BERTON (pour ta cuisine en particulier), Michèle BRILLARD, Yves COURTY, Annick et Frédéric ESNARD, Michèle FERRER, Yves GRUEL, Sophie IOCHMANN, Gilles LALMANACH, Pascale REVERDIAU, Nathalie RICHE (sympa les cheveux...)

Je tiens à remercier, tout particulièrement, Nathalie HEUZE-VOURC'H et Fabien LECAILLE pour leur bonne humeur et nos discussions en tout genre. Nath, merci pour les matchs de squash...

Je remercie également tous ceux qui sont passés au laboratoire pendant ces trois ans en particulier « Gentil » Benjamin BRILLET, Sandrine CASTELLA, Emmanuel GODAT, Nicolas GUYOT, Chris PLANQUE.

Merci à Claude LEBOS et Valérie LABAS pour leur très grande gentillesse et leur aide précieuse pour les analyses en microscopie et en spectrométrie de masse.

Merci aux nouveaux arrivants : Gwenhael JEGOT, Hélène SERRANO, Annabelle TANGA, Noémie MICHEL, Clément NAUDIN.

Et enfin, les meilleurs pour la fin, les membres du bureau des étudiants qui se divise en trois groupes : le DARK Side, La terre du milieu et le BRIGHT Side...

Dans le DARK Side, je tiens à remercier Guillaume « El Pulpo » GAUD, mon acolyte moniteur et co-fondateur du DARK Side avec Mireille AINCIBURU. Laurent GUILLEMINAULT, plus communément appelé « El Medico ou Fends la bise », le seul médecin du groupe. Merci pour tous nos délires et tous ces bons moments passés ensemble.

Dans La Terre du Milieu, je tiens à remercier Jérôme JAILLET, dit « l'imprimante ou Bouclette ». Merci pour ton aide précieuse dans mes expériences. Florian VEILLARD, dit « Dame Pipi ». Merci pour tous les bons moments passés ensembles. Flo, tu es la première personne que je rencontre capable de manger son poids en saucisson et en pistaches. Nos discussions tardives vont me manquer. Timothée KALUPOV « Timofey, Timofée, Tima..., Tintin », le médecin, joueur de foot professionnel, champion d'échecs Russe. Merci.

Dans le BRIGHT Side. Je tiens à remercier mes quatre compères. Sophie « Country » HAMARD, Christelle PARENT, également appelée « Crételle, Critelle, Crutelle, Crotelle... ». Merci de m'avoir fait découvrir ce langage si particulier qu'est le « creutelle ». Agnès « Agueuness » MAILLET, la secrétaire du BRIGHT Side. Merci de nous avoir supporté, en particulier Alex et moi et merci pour ton « bougon comme une tombe ». Et enfin, Alexandre GAUTHIER appelé « Le Rouk-mout', Le Gro-mout' ». Mon collègue de délires en tout genre. Merci de votre amitié et de votre gentillesse. Les chansons du mois vont me manquer.

Je remercie mes amis de l'Ile de Ré, de La Rochelle, de Paris, de Vendée et du Gabon qui m'ont soutenu pendant ces trois ans. Une pensée toute particulière pour Audrey DAUBA qui m'a supporté en dehors du labo tous les soirs pendant deux ans. Merci La Daub'.

Je souhaite enfin remercier les personnes qui me sont les plus chères :

- Mes parents et mes deux sœurs Julie et Laura
- Mes grands-parents, qui je pense, n'ont pas encore très bien cerné le sujet de ma thèse
- A ma moitié, Julie et à notre fils qui arrivera bientôt. Julie, merci pour ta patience et ton soutien permanent

RESUME

Les travaux de cette thèse ont porté sur l'étude des propriétés fonctionnelles d'inhibiteurs recombinants polyvalents ciblant les trois protéases à sérine du neutrophile (élastase, protéase 3, cathepsine G), libérées massivement au cours des inflammations pulmonaires. Ces inhibiteurs, dérivés de molécules naturelles (élafine, trappine-2, SLPI), interagissent fortement avec les trois protéases à sérine, sous forme soluble ou liée aux membranes des neutrophiles et possèdent des propriétés anti-bactériennes indépendantes de leurs capacités inhibitrices. De plus, nous avons montré que ces inhibiteurs peuvent être ancrés à différentes protéines de structure par transglutamination tout en conservant leurs propriétés inhibitrices. Par leurs différentes propriétés, ces inhibiteurs représentent des molécules particulièrement attractives dans le cadre du développement d'une stratégie thérapeutique basée sur l'administration d'anti-protéases par aérosol pour le traitement de maladies pulmonaires inflammatoires.

Mots-clés : Neutrophiles, protéases à sérine, inhibiteurs, trappine-2, SLPI, inflammation pulmonaire.

RESUME EN ANGLAIS

In this study, we have analysed the properties of recombinant polyvalent inhibitors of the three neutrophil serine proteinases (elastase, proteinase 3, cathepsin G), massively released during inflammatory events in various lung diseases. These inhibitors, derived from natural endogeneous inhibitors (elafin, trappin-2, SLPI), interact tightly with both free and membrane-bound neutrophil serine proteinases and possess antimicrobial properties that are independent from their inhibitory capacity. We have also shown that these polyvalent inhibitors can be covalently bound to the extracellular matrix proteins by a transglutaminase and that they retain their inhibitory properties in these conditions. With their various biological properties, these inhibitors are attractive molecules for the development of an aerosol-based therapeutic strategy for the treatment of inflammatory lung diseases.

Key words : Neutrophils, serine proteinases, inhibitors, trappin-2, SLPI, lung inflammation.

SOMMAIRE

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION.....1

Chapitre I : Pathologies inflammatoires pulmonaires : rôle de l'épithélium bronchique et des cellules de l'immunité.....3

I. Généralités.....3

II. Les pathologies pulmonaires inflammatoires.....3

A. Les pathologies chroniques obstructives des voies aériennes.....3

1. L'asthme.....3

2. Les broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO).....4

3. La mucoviscidose.....7

B. Les insuffisances respiratoires aiguës.....9

1. Les exacerbations de BPCO.....9

2. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA).....10

C. Autres pathologies.....11

1. La fibrose pulmonaire.....11

2. Les infections microbiennes.....11

III. Défense anti-microbienne de l'appareil respiratoire et réaction inflammatoire.....12

A. La défense des voies aériennes supérieures et des bronches.....12

1. les barrières anatomiques.....12

2. L'appareil mucociliaire.....12

3. L'épithélium bronchique.....13

4. Les IgA.....16

5. Les cellules dendritiques et les lymphocytes.....17

B. La défense immunitaire des alvéoles pulmonaires.....17

IV. Les cellules de l'immunité et la réaction inflammatoire.....19

A. Les basophiles.....19

B. Les mastocytes.....20

C. Les éosinophiles.....21

D. Les cellules dendritiques.....21

E. Les lymphocytes.....22

F. Les macrophages.....24

1. Les oxydants dérivés de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS).....25

a. Les ROS.....26

b. Les RNS.....26

2. Les protéases.....27

a. Les MMPs et les TIMPs.....27

b. Les protéases à cystéine et les cystatines.....28

3. Les cytokines, les chimiokines, les facteurs de croissance, les dérivés lipidiques.....29

a. Les cytokines.....29

b. Les chimiokines.....30

c. Les facteurs de croissance.....30

d. Les dérivés lipidiques.....30

V. Rôle de la coopération des cellules de l'immunité, des cellules épithéliales et endothéliales dans les BPCO.....31

Chapitre II : Les neutrophiles, cellules de l'immunité.....33

I. Généralités sur le neutrophile.....33

II. Les granules du neutrophile.....34

A. Les granules azurophiles 35

B. Les granules secondaires.....38

C. Les granules tertiaires.....40

D. Les vésicules de sécrétion.....43

III. Les neutrophiles et la réaction inflammatoire.....43

A. L'initiation.....43

B. La capture, le roulement et le roulement lent.....44

C. L'activation et l'arrêt.....45

D. L'adhérence forte à l'endothélium.....46

E. L'infiltration « crawling » et la transmigration transendothéliale.....46

1. La migration intercellulaire.....47

2. La migration intracellulaire.....47

F. La migration à travers la membrane basale.....47

G. La migration trans-épithéliale.....48

H. La phagocytose et la dégranulation.....48

I. Libération de médiateurs de l'inflammation.....50

J. L'apoptose et la nécrose.....51

K. Les pièges neutrophiliques ou NETs.....52

L. La résolution/perpétuation de la réaction inflammatoire.....54

Chapitre III : les protéases à sérine de neutrophiles et leurs différentes fonctions.....56

I. Rôle de la balance protéase/anti-protéase dans la physiopathologie pulmonaire.....56

II. Les protéases à sérine du neutrophile.....57

A. Généralités.....57

B. L'élastase leucocytaire (HNE).....60

1. Structure et propriétés physico-chimiques.....60

2. Activité et spécificité enzymatique.....61

C. La protéase 3 (Pr3).....62

1. Structure et propriétés physico-chimiques.....62

2. Activité et spécificité enzymatique.....63

D. La cathepsine G (CatG).....64

1. Structure et propriétés physico-chimiques.....64

2. Activité et spécificité enzymatique.....65

III. Les propriétés biologiques des protéases à sérine de neutrophiles.....66

A. La défense anti-microbienne.....67

B. La modulation des chimiokines et des cytokines.....68

1. La modulation des chimiokines.....68

2. La modulation des cytokines.....69

C. La régulation des facteurs de croissance.....70

D. La modulation des récepteurs cellulaires.....70

E. L'inactivation des récepteurs de surface.....72

F. L'adhésion et la migration cellulaire.....	74
G. L'apoptose.....	75
H. L'activation des cellules de l'immunité.....	75
I. L'activation des protéases et inactivation des inhibiteurs.....	76
J. L'implication dans les pathologies humaines.....	77

Chapitre IV : La régulation de l'activité protéolytique des protéases à sérine de neutrophiles.....80

I. Les inhibiteurs des protéases à sérine de neutrophile.....80

A. L'alpha 2 Macroglobuline.....	80
B. Les Serpines.....	82
1. Les serpines extracellulaires.....	84
a. L' α 1-Proteinase Inhibitor.....	84
b. L' α 1-Antichymotrypsine.....	86
2. Les serpines intracellulaires.....	87
a. Le MNEI.....	87
b. Le PI6.....	88
c. Le PI9.....	88
d. Le SCCA2.....	89
C. Les inhibiteurs canoniques.....	89
1. Les églines.....	92
2. L'EPI-hNE4.....	93
3. Les chélonianines.....	94

II. Le SLPI.....95

A. Historique.....	95
B. Structure du gène.....	95
C. Structure de la protéine.....	96
D. Propriétés inhibitrices.....	98
E. Expression de la protéine.....	100

III. L'élafine et son précurseur : la trappine-2.....102

A. Historique.....	102
B. Structure du gène.....	103
C. Structure de la protéine.....	104
1. Le domaine élafine.....	104
2. Le domaine cémentoïne.....	105
D. Propriétés inhibitrices.....	109
E. Expression de la protéine.....	111

IV. Activités biologiques du SLPI, de l'élafine et de la trappine-2.....111

A. Les propriétés anti-inflammatoires.....	112
1. Activités anti-inflammatoires dépendantes de leurs fonctions inhibitrices.....	112
2. Activités anti-inflammatoires indépendantes de leurs fonctions inhibitrices.....	114
B. Les propriétés anti-microbiennes.....	115
1. Les propriétés anti-bactériennes.....	115
2. Les propriétés anti-fongiques.....	117
3. Les propriétés anti-virales.....	118
C. Le SLPI, l'élafine et cancer.....	118

V. Les inhibiteurs synthétiques.....120

VI. Autres facteurs de régulation de l'activité protéolytique des protéases à sérine de neutrophiles.....121

A. Les inhibiteurs d'origine microbienne.....	122
B. L'oxydation.....	123
C. Les polyanions.....	123
1. Les acides nucléiques.....	124
2. Les glycosaminoglycanes, les protéoglycanes et les glycoprotéines.....	125

Chapitre V : Utilisation thérapeutique des inhibiteurs.....127

A. L' α 1-PI.....	127
B. Le SLPI.....	128
C. La trappine-2.....	129

OBJECTIFS DE LA THESE.....130

TRAVAUX PERSONNELS.....133

Publication 1 : Etude des propriétés anti-bactériennes et anti-fongiques de la trappine-2.....133

I. Contexte de l'étude.....	133
II. Méthodologie.....	134
A. Production du mutant atténué T2 A62D/M63L.....	135
B. Tests d'activité anti-microbienne.....	137
III. Résultats.....	138
A. Activité anti-microbienne de la T2.....	138
1. Activité anti-bactérienne de la T2.....	138
2. Activité anti-fongique de la T2.....	139
B. Implication du caractère cationique de l'inhibiteur dans l'activité anti-microbienne.....	139
1. Influence de l'héparine.....	139
2. Influence de la concentration en NaCl.....	140
C. Etude en microscopie électronique à balayage (SEM).....	140
D. Rôle de la T2 dans la relation hôte/pathogène.....	140
1. Inhibition de protéases microbiennes.....	140
2. Dégradation de la T2 par les protéases microbiennes.....	141
IV. Conclusions et perspectives.....	141

Publication 2 : Développement d'inhibiteurs polyvalents des protéases à sérine de neutrophile dérivés de l'élafine, du SLPI et de la trappine-2.....144

I. Contexte de l'étude.....	144
II. Méthodologie.....	145
A. Les chimères SLPI2-Elaf et Elaf-SLPI2.....	145
B. T2 A62L et T2 R60Q/A62L/R69F.....	146
III. Résultats.....	147
A. Propriétés inhibitrices vis-à-vis des protéases solubles.....	147
B. Inhibition des protéases liées aux membranes des neutrophiles.....	149
C. Inhibition des protéases solubles par les inhibiteurs fixés à la fibronectine et à l'élastine par transglutamination.....	151
IV. Résultats complémentaires.....	152

A. Inhibition des protéases d' <i>A. fumigatus</i> par le SLPI et la T2 A62L.....	152
B. CemSLPI ₂ et CemAQSLPI ₂ , des inhibiteurs d'HNE et de CatG capables de se lier à la fibronectine sous l'action de la TGase2.....	153
1. Production de CemSLPI ₂ et CemAQSLPI ₂	154
2. Détermination des propriétés inhibitrices de ces deux inhibiteurs.....	155
3. Inhibition de l'HNE et de la CatG liées aux membranes des neutrophiles par CemSLPI ₂ et CemAQSLPI ₂	155
4. Inhibition de l'HNE par CemSLPI ₂ et CemAQSLPI ₂ liés à la fibronectine par la TGase2.....	156
V. Conclusions et perspectives.....	157

Résultats non publiés : Etude des propriétés de transglutamination de l'élafine, de la trappine-2 et du SLPI.....	159
--	-----

I. Contexte de l'étude.....	159
II. Méthodologie.....	159
A. Expériences de transglutamination.....	159
B. Les inhibiteurs.....	160
C. Analyse en spectrométrie de masse LC/MS.....	160
III. Résultats.....	161
A. Caractérisation <i>in vitro</i> des propriétés de transglutamination de l'élafine et de la T2.....	161
B. Caractérisation <i>in vitro</i> des propriétés de transglutamination du SLPI avec la TGase2...	164
C. Compétition pour la fixation du SLPI et de la T2 sur différents substrats protéiques.....	165
D. Analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF des produits de réaction de transglutamination.....	166
E. Caractérisation <i>in vitro</i> des propriétés de transglutamination de l'élafine, de la T2 et du SLPI avec le FXIIIa.....	170
F. Propriétés inhibitrices du SLPI lié par transglutamination.....	173
IV. Conclusions et perspectives.....	175

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	177
---	------------

I. Conclusion générale.....	177
II. Perspectives.....	185

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

INDEX DES FIGURES

Figure 1. Coupes histologiques de bronches de patients atteints d'asthme (asthma) et de BPCO (COPD).....	5
Figure 2. Représentation schématique des bronches et des alvéoles chez un patient atteint de BPCO débutante et évoluée.....	6
Figure 3. Comparaison de la structure des alvéoles d'un patient sain et d'un patient atteint d'emphysème pulmonaire.....	6
Figure 4. Mécanismes inflammatoires dans les BPCO.....	7
Figure 5. Perturbation de la défense immunitaire innée vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i> chez les patients atteints de mucoviscidose.....	9
Figure 6. Organisation de l'épithélium bronchique.....	13
Figure 7. Implication des macrophages dans la réaction inflammatoire.....	25
Figure 8. Implication des MMP dans la libération de peptides chimioattractants pour les neutrophiles.....	28
Figure 9. Schéma représentatif des différentes cellules, des médiateurs de l'inflammation et leurs effets dans les pathologies inflammatoires pulmonaires.....	31
Figure 10. Structure du polynucléaire neutrophile quiescent en suspension observée en microscopie électronique à balayage (A) et en microscopie électronique à transmission (B).....	33
Figure 11. Représentation des différents stades de différenciation des neutrophiles.....	33
Figure 12. Observation en microscopie électronique à transmission des granules intracytoplasmiques du neutrophile quiescent.....	35
Figure 13. Les différentes étapes de la migration transendothéliale des neutrophiles.....	44
Figure 14. Les différentes étapes de la formation des NETs.....	52
Figure 15. Observation en microscopie à balayage de bactéries à Gram positif et négatif piégées dans les NETs.....	53
Figure 16. Représentation en ruban des structures tridimensionnelles de l'élastase leucocytaire (HNE, code PDB :1PPF), de la protéase 3 (Pr3, code PDB : 1FUJ) et de la cathepsine G (CatG, code PDB : ICGH).....	61
Figure 17. Mécanisme d'inhibition des protéases par l' α 2M.....	81
Figure 18. Mécanisme réactionnel de l'interaction entre une serpine (I) et une protéase (E).	83
Figure 19. Les différentes conformations des serpins.....	84
Figure 20. Superposition des segments P3-P'3 des boucles inhibitrices de l'OMSVP3, du SSI et du BPTI.	90
Figure 21. Structure tridimensionnelle des membres représentatifs de chaque famille des inhibiteurs canoniques.....	91
Figure 22. Représentation schématique du SLPI, de la trappine-2 et de l'élafine.....	96
Figure 23. Alignements de séquence entre le domaine N-terminal du SLPI (SLPI ₁), le domaine C-terminal du SLPI (SLPI ₂), l'élafine.....	97
Figure 24. Structure tridimensionnelle (représentation en ruban) du SLPI et de l'élafine... ..	98
Figure 25. Alignement de séquences des boucles inhibitrices du domaine élafine de la trappine-2 et du domaine 2 du SLPI humain et murin.....	100
Figure 26. Mécanisme de fixation de la trappine-2 à des protéines de la matrice extracellulaire par transglutamination.....	106
Figure 27. Localisation des résidus de la trappine-2 impliqués dans la réaction de transglutamination avec des protéines de la couche cornée de l'épiderme.....	107
Figure 28. Structure de la putrescine et du dansyl-cadavérine, molécules substrats de transglutaminase.....	109
Figure 29. Méthodologie de construction du mutant T2 A62D/M63L et séquences des amorces utilisées.....	136
Figure 30 : Représentation schématique du vecteur pPIC9.....	137

Figure 31 : Représentation schématique des différents inhibiteurs produits dans cette étude.	145
Figure 32. Courbe d'inhibition des NSPs liées aux membranes en fonction de la concentration en inhibiteur.	149
Figure 33. Inhibition des trois NSPs liées aux membranes par les inhibiteurs sauvages l'élafine, la T2, le SLPI et leur dérivé l'Elaf-SLPI2, le SLPI2-Elaf et la T2 A62L à une concentration de 100 nM.	150
Figure 34. Inhibition des trois NSPs par l'élafine, la T2, Elaf-SLPI2 et la T2 A62L liés à la fibronectine sous l'action de la TGase2.	151
Figure 35. Inhibition des trois NSPs par l'élafine, la T2, Elaf-SLPI2 et la T2 A62L liés à l'élastine sous l'action de la TGase2.	152
Figure 36. Contrôle par différents inhibiteurs de la dégradation de la fibronectine par les surnageants de culture de deux souches d' <i>A. fumigatus</i> isolées d'un patient neutropénique atteint d'aspergillose pulmonaire et d'un patient atteint de mucoviscidose.	153
Figure 37. A. Electrophorèse SDS-PAGE haute résolution des protéines CemSLPI ₂ (1) et CemAQLSLPI ₂ (2) après purification par FPLC selon le protocole de Zani <i>et al.</i> (Zani et al., 2004). B. Fixation de CemSLPI ₂ (1) et CemAQLSLPI ₂ (2) sur la fibronectine par la TGase2.	155
Figure 38. Inhibition de l'HNE (A) et de la CatG (B) liées aux membranes des neutrophiles par CemSLPI ₂ .	156
Figure 39. Inhibition de l'HNE par le CemSLPI ₂ (A) et le CemAQLSLPI ₂ (B) fixés à la fibronectine par la TGase2.	157
Figure 40. Représentation schématique de la dansyl-cadavérine.	161
Figure 41. Réaction de transglutamination <i>in vitro</i> de l'élafine avec la TGase2.	162
Figure 42. Réaction de transglutamination <i>in vitro</i> de la trappine-2 avec la TGase2.	163
Figure 43. Réaction de transglutamination <i>in vitro</i> du SLPI avec la TGase2.	164
Figure 44. Compétition entre la trappine-2 et le SLPI pour la fixation sur l'élastine et la fibronectine sous l'action de la TGase2.	166
Figure 45. Analyse en MALDI-TOF de l'élafine seule (A), de l'élafine couplée à la DsC (B) et de l'élafine couplée au peptide PGGQQIV (C) par transglutamination.	167
Figure 46. Analyse en MALDI-TOF de la trappine-2 seule (A) et de la trappine-2 couplée à la DsC (B) par transglutamination.	168
Figure 47. Analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF du SLPI seul (A), du SLPI couplé à la DsC (B) et du SLPI couplé au peptide TG1 (C) en présence de TGase2.	169
Figure 48. Réaction de transglutamination <i>in vitro</i> de l'élafine (A) et de la trappine-2 (B) avec le FXIIIa.	170
Figure 49. Réaction de transglutamination <i>in vitro</i> du SLPI avec le FXIIIa.	171
Figure 50. Compétition entre la trappine-2 et le SLPI pour la fixation sur la fibronectine sous l'action du FXIIIa.	172
Figure 51. Inhibition de l'HNE par le CemSLPI ₂ , le CemAQLSLPI ₂ , le SLPI ₂ , le SLPI, l'élafine et la trappine-2 liés à la fibronectine (A) et à l'élastine (B) par la TGase2.	174
Figure 52. Fixation de CemSLPI ₂ (1) et CemAQLSLPI ₂ (2) sur la fibronectine par la TGase2 et le FXIIIa.	175
Figure 53. Les différentes cibles possibles dans les stratégies anti-inflammatoires dans le traitement des BPCO.	184

INDEX DES TABLEAUX

Tableau I. Localisation et ligands microbiens des 10 TLRs humains.....	15
Tableau II. Contenu des différents granules du neutrophile.....	36
Tableau III. Cytokines libérées par les neutrophiles <i>in vitro</i>	50
Tableau IV. Caractéristiques biochimiques principales de l'HNE, de la Pr3 et de la CatG.	66
Tableau V. Valeurs des constantes de vitesse d'association de l' α 2M et des autres serpins avec les protéases à sérine.....	80
Tableau VI. Les différentes familles des inhibiteurs canoniques.....	89
Tableau VII. Valeurs de K_i en nM pour l'interaction du SLPI, de l'élafine, de la trappine-2 et des églines b et c avec différentes protéases à sérine.....	93
Tableau VIII. Les différentes transglutaminases de mammifères.....	108
Tableau IX. Constantes cinétiques de l'inhibition de l'HNE, de la Pr3 et de la PPE par l'élafine et la trappine-2.....	109
Tableau X. Propriétés biologiques du SLPI et de l'élafine.....	112
Tableau XI. Comparaisons des propriétés biologiques des différents inhibiteurs endogènes de l'HNE, de la Pr3 et de la CatG.....	132
Tableau XII. Liste des amorces de mutagenèse utilisées pour réaliser les différents inhibiteurs décrits dans l'article.....	146
Tableau XIII. Comparaison des valeurs de K_i et de k_{ass} obtenues avec l'élafine, la trappine- 2, le SLPI et les différents mutants vis-à-vis des protéases à sérine de neutrophiles.....	148
Tableau XIV. Valeurs de K_i obtenues pour le SLPI, CemSLPI ₂ , CemAQLSPI ₂ et SLPI ₂ vis- à-vis de l'HNE et de la CatG.....	155

LISTE DES ABREVIATIONS

A.

A. fumigatus: Aspergillus fumigatus

Abz: o-aminobenzoyl

Ac-PGP: peptide Acétyl-Proline-Glycine-Proline

ACT: alpha1-antichymotrypsin

ADCC: Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity

ALI: Acute Lung Injury

ALP: AntiLeukoProtease

ANCA: AntiNeutrophil Cytoplasmic Antibodies

AP-3: Adaptator Protein-3

ATCC : American Tissue Culture Collection

B.

B. catarrhalis: Branhamella catarrhalis

BI: Bronchial Inhibitor

BPCO: Broncho-Pneumopathies Chroniques Obstructives

BPI: Bactericidal/Permeability-Increased protein

C.

C. albicans: Candida albicans

C/EBPβ: CCAAT/Enhancer Binding Protein beta

CAM: Cellular Adhesion Molecule

CatG: Cathepsine G

CFTR: Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator

CINC: Cytokine-Induced Chemoattractants

CLR: C-type Lectin Receptor

CMH: Complexe Majeur d'Histocompatibilité

COX-2: Cyclooxygénase

CPA: Cellules Présentatrices d'Antigène

CrmA: Cytokine response modifier A

CRP: C-Reactive Protein

CTAP-III: Connective Tissue-Activating Peptide-III

CUSI: Cervix Uterine Secretion Inhibitor

D.

Dsc: Dansyl-cadavérine

DNase: Désoxyribonucléase

DPPI: DiPeptidyl Peptidase I

E.

E. coli: Escherichia coli

ECP: Eosinophil Cationic Protein

EDDnp: Ethylènediamine 2,4-dinitrophényl

EGFR: Epithelial Growth Factor Receptor

ELAM-1: Endothelial Cell-Leukocyte Adhesion Molecule-1

ENA-78: Epithelial cell-derived Neutrophil-Activating peptide-78 kDa

EPO: Eosinophil peroxydase

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase

ERM: Ezrin, Radixin and Moesin

ESAM: Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule

ESI: Elastase-Specific Inhibitor

ESL1: E-Selectin-Ligand-1

ESPG: Eosinophil Specific Granule Proteins

F.

fMLP: N-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine

FPR: Formyl Peptide Receptor

G.

GAG: Glycosaminoglycane

GAS: Group A *Streptococcus*

G-CSF: Granulocyte-Colony-Stimulating Factor

GM-CSF: Granulocyte Macrophage-Colony-Stimulating Factor

GOLD: Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease

GPI: Glycosyl Phosphatidyl Inositol

GRO- α : Growth Related Oncogen-alpha

H.

H. influenzae: *H. influenzae*

HAT: Human Airway Trypsin-like

HBP: Heparin-Binding Protein

hCAP18: human Cationic Antimicrobial Peptide 18 kDa

hCAP37: human Cationique Antimicrobial Protein 37 kDa

HDM: House Dust Mite

HGF: Hepatocyte Growth Factor

HIV-1: Human Immunodeficiency Virus-1

HMBG1: High Mobility Box Group-1

HMG-1: High-Mobility Group-1

HNE: Human Neutrophil Elastase

HPV-16: Human PapillomaVirus de type 16

HSV-1/2: Herpes Simplex Virus-1/2

HUSI-I: HUman Seminal plasma Inhibitor-I

I.

ICAM1: InterCellular Adhesion Molecule-1

IgA/G/E: Immunoglobuline A/G/E

IL-1ra: IL-1 receptor antagonist

IL-1 β : Interleukine-1 β

IL-6: Interleukine-6

IL-8: Interleukine-8

INF- γ : Interféron- γ

iNOS: inducible Nitric Oxide Synthase

IP-10: Interferon-gamma-induced protein of 10kDa

IpaB: Invasion plasmid antigen B

IRAK: IL-1 Receptor-Associated Kinase

ISP: Implantation Serine Protease

J.

JAM: Junctional Adhesion Molecule

JNK: Jun N-terminal Kinase

K.

K. pneumoniae: *Klebsiella pneumoniae*

KC: Keratinocyte-derived Chemokine

kDa: kiloDalton

KO: Knock-Out

L.

L. pneumophila: *Legionella pneumophila*
LAP: Latency-Associated Protein
LBP: LPS-Binding Protein
LFA1: Leukocyte Function-Associated Antigen-1
LLBA: Liquide de Lavage Bronchiolo-alvéolaire
LPS: Lipopolysaccharide
LTA: Lipoteichoic Acid
LTB4/C4: Leucotriène B4/C4
LTBP: Latent TGF-beta-Binding Protein
LTreg: LT régulateur
LB: Lymphocytes B
LT: Lymphocytes T
Lyst: Lysosomal Trafficking regulator

M.

MAC-1: Macrophage Antigen-1
MADCAM1: Mucosal vascular Addressin Cell-Adhesion Molecule 1
MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase
MBP-1/2: Major Basic Protein-1/-2
MCP-1 : Monocyte Chemotactic Protein-1
MIG: Monokine-Induced by interferon Gamma
MIP-1 α / β : Macrophage Inflammatory Protein-1 α / β
MIP-2: Macrophage Inflammatory Protein-2
MMPs: Matrix MetalloProteinases
mNE: murin Neutrophil Elastase
MNEI: Monocyte Neutrophil Elastase Inhibitor
MPI: Mucosal Proteinase Inhibitor
MT6-MMP: Membrane-Type 6 MMP
MyD88: Myeloid Differentiation primary-response gene 88

N.

NAP-2: Neutrophil-Activating Peptide-2
NGAL: Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin
NK: Lymphocytes Natural Killer
NLR: NOD-Like Receptor
NO: monoxyde d'azote
NOD: Nucleotide-Binding Oligomerization Domain
NOS: Nitric Oxide Synthase
Nramp1: Natural Resistant-Associated Macrophage Protein 1
NSPs: Neutrophil Serine Proteinases

O.

OmpA: Outer membrane protein A

P.

P. aeruginosa: *P.aeruginosa*
P. gingivalis: *Porphyromonas gingivalis*
PAF: Platelet-Activating Factor
PAI-1/2: Plasminogen Activator Inhibitor-1/2
PAMP: Pathogen Associated Molecular Patterns
PAR: Protease-Activated Receptor
PECAM-1: Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PGD2: Prostaglandine 2
PGE2: Prostaglandine E2

PGRP-S: Peptidoglycan Recognition Protein-S
 PI3K: Phosphoinositide 3 kinase
 PI6/9: Proteinase Inhibitor 6/9
 PKC: Protein Kinase C
 PLS: Papillon-Lefevre Syndrome
 PML-RAR α : ProMyelocytic Leukaemia-Retinoic-Acid-Receptor- α
 PMVEC: Pulmonary Microvascular Endothelial Cells
 PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma
 PPE: Porcine Pancreatic Elastase
 Pr3: Proteinase 3
 PRR: Pattern Recognition Receptor
 PS: PhosphatidylSerine
 PSA: Prostate Specific Antigen
 PSGL1: P-selectin Glycoprotein Ligand-1

R.

RAGE: Receptor for Advanced Glycation End-products
 RCL: Reactive Center Loop
 REST: Rapidly Evolving Seminal vesicle Transcribed
 RNS: Reactive Nitrogen Species
 ROS: Reactive Oxygen Species
 RTPI: Red sea Turtle Proteinase Inhibitor

S.

S. aureus: *Staphylococcus aureus*
S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*
S. epidermidis: *Staphylococcus epidermidis*
S. flexneri: *Shigella flexneri*
S. marcescens: *Serratia marcescens*
S. pneumoniae: *Streptococcus pneumoniae*
 SCCA 1/2: Squamous Cell Carcinoma Antigen 1/2
 SCCE: Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme
 SCN: Severe Congenital Neutropenia
 SDRA: Le Syndrome de Détresse Respiratoire Aiguë
 Serpin: Serine Proteinase Inhibitor
 SKALP: SKin-derived AntiLeukoProtease
 SLPI: Secretory Leukocyte Protease Inhibitor
 SNP: Single Nucleotide Polymorphism
 SOD: SuperOxide Dismutase
 SP-A/D: Surfactant Protein-A/D
 SPAI-2: Sodium/Potassium ATPase Inhibitor-2
 STBM: SyncytioTrophoBlast Microparticules
 SVP-1: Seminal Vesicle Protein-1
 SWAM1/2: Single WAP Motif Protein 1/2

T.

TACE: Tumor-necrosis factor Activating-Converting Enzyme
 TFPI: Tissue Factor Pathway Inhibitor
 TGase: transglutaminase
 TGase: TransGlutaminase tissulaire
 TGase2: TGase tissulaire de type 2 de foie de cobaye
 TGF- α/β : Transforming Growth Factor- α/β
 TIMP: Tissue Inhibitor of MetalloProteinase
 TLR: Toll-Like Receptor
 TNF- α : Tumor Necrosis Factor-alpha
 TRAF-6: TNF-Receptor-Associated Factor-6
 Trappine-2: T2

U.

uPA: urokinase-type Plasminogen Activator

uPAR: urokinase-type Plasminogen Activator Receptor

V.

VCAM1: Vascular Cell-Adhesion Molecule-1

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VRS: Virus Respiratoire Syncytial

VVO: Vesiculo-Vacuolar Organelles

W.

WAP: Whey Acidic Protein

α .

α 1-AT: α 1-Antitrypsin

α 1-PI: alpha1-Proteinase Inhibitor

α 2M: alpha 2 Macroglobuline

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION

Les poumons jouent un rôle primordial dans notre organisme : ils apportent l'oxygène nécessaire pour le maintien de l'intégrité des tissus et des organes. De par leur étroite interaction avec l'environnement extérieur, les poumons vont être en permanence exposés à des polluants irritants, des allergènes et autres microorganismes (bactéries, champignons et virus) entraînant des situations qui peuvent être fatales pour notre organisme. Pour veiller au maintien de la fonction pulmonaire, notre défense immunitaire va être constamment sollicitée. Les cellules épithéliales pulmonaires et les macrophages alvéolaires vont être les premières cellules à être en contact avec ces agents toxiques pour l'organisme et vont déclencher une réaction de défense, la réaction inflammatoire. Cette réaction inflammatoire va être médiée par la libération de molécules « signal » appelées cytokines, chimiokines et autres médiateurs lipidiques, molécules possédant de fortes propriétés chimioattractives pour les cellules de la défense immunitaire innée circulante comme les lymphocytes et les polynucléaires neutrophiles, plus simplement nommés neutrophiles.

Les neutrophiles, comme les macrophages, sont capables de phagocyter les différents pathogènes pour les détruire. Ils sont également capables de libérer dans l'environnement extracellulaire des molécules à activité anti-microbienne comme les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS), des peptides cationiques (lysozyme, BPI, cathélicidine), des protéases à sérine ou NSPs (*Neutrophil Serine Proteinases*) mais aussi des molécules pro-inflammatoires comme des cytokines et des métalloprotéases matricielles ou MMPs (*Matrix MetalloProteinases*). L'environnement pro-inflammatoire va permettre l'élimination des pathogènes mais peut devenir délétère pour l'organisme si cet état inflammatoire persiste. En effet, les espèces réactives et les protéases, en particulier les NSPs, sont capables de détruire les protéines de structure des parois alvéolaires comme l'élastine et le collagène, ainsi que des constituants majeurs de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et les laminines, libérant ainsi de petits peptides chimioattractants qui vont induire un nouveau recrutement de neutrophiles et la perpétuation de l'état inflammatoire.

Les trois NSPs : l'élastase leucocytaire (HNE), la protéase 3 (Pr3) et la cathepsine G (CatG) jouent un rôle très important dans la lutte contre les microorganismes et dans le processus inflammatoire pulmonaire. Ces trois protéases sont naturellement contrôlées par

différents inhibiteurs endogènes, inhibiteurs qui sont très vite inactivés soit par des phénomènes oxydatifs ou par clivage protéolytique conduisant ainsi à un déséquilibre de la balance protéases/anti-protéases en faveur des protéases. Ce déséquilibre de la balance protéases/anti-protéases contribue à la destruction des tissus pulmonaires et peut mener au développement de pathologies inflammatoires comme les broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO), les exacerbations des réactions asthmatiques et le syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA). Il est à noter que les BPCO sont, selon l'OMS, la douzième cause de morbidité et la sixième cause de mortalité dans le monde. On estime qu'en 2020, elles deviendront la cinquième cause d'handicap et la troisième cause de mortalité, juste après les maladies coronariennes et les maladies vasculaires cérébrales. C'est pourquoi les trois NSPs semblent être des cibles thérapeutiques intéressantes pour le traitement de ces pathologies.

La revue bibliographique de cette thèse s'organise en cinq parties. La première partie s'est intéressée à décrire différentes pathologies pulmonaires ainsi que le rôle des autres cellules de l'immunité dans la réaction inflammatoire. La seconde, à décrire les neutrophiles et leur rôle dans l'immunité innée. Les troisième et quatrième parties traitent des différentes fonctions des NSPs et de la régulation de leurs activités protéolytiques, respectivement. Enfin, les thérapies anti-inflammatoires basées sur l'administration, par aérosol, d'inhibiteurs de ces protéases seront abordées dans la dernière partie.

Chapitre I : Pathologies inflammatoires pulmonaires : rôle de l'épithélium bronchique et des cellules de l'immunité.

I. Généralités

Les poumons ont une situation unique dans l'organisme car ils sont en relation directe et constante avec l'environnement extérieur. Leur rôle est primordial, il permet l'oxygénation de tous les tissus et des organes.

Le poumon constitue la première barrière de défense contre les particules et/ou les pathogènes inhalés. De par sa structure, sa composition et sa capacité à recruter les cellules de l'immunité comme les macrophages et les neutrophiles, il va pouvoir organiser la réponse immunitaire inflammatoire. Le contenu enzymatique des neutrophiles va jouer un rôle important dans cette réaction inflammatoire. En effet, ces cellules contiennent différents constituants en particulier des protéases dont les trois NSPs que sont l'HNE, la Pr3 et la CatG, qui sont impliquées dans différents processus biologiques comme le remaniement de la matrice extracellulaire, la maturation de cytokines et la défense anti-microbienne. Mais ces enzymes peuvent également avoir un rôle dans le développement de pathologies inflammatoires pulmonaires.

II. Les pathologies pulmonaires inflammatoires

A. Les pathologies chroniques obstructives des voies aériennes

1. L'asthme

L'asthme est une des maladies chroniques les plus fréquentes. C'est un désordre inflammatoire qui s'accompagne de remaniements durables de la structure des voies aériennes. Cette inflammation est secondaire à un infiltrat de cellules inflammatoires, en particulier les mastocytes et les éosinophiles. La réaction inflammatoire, associée à une hyperréactivité bronchique en réponse à différents stimuli comme le tabac, les allergènes et les polluants atmosphériques, va entraîner des symptômes comme la toux, l'oppression thoracique et la dyspnée qui sont en rapport avec une obstruction bronchique diffuse et variable, réversible spontanément ou sous l'effet de traitement par des bronchodilatateurs, des glucocorticoïdes anti-inflammatoires et plus récemment, des bloqueurs de récepteurs aux leucotriènes.

L'asthme est une réaction inflammatoire complexe, touchant les voies aériennes supérieures et inférieures mais pas le parenchyme. En plus des mastocytes et des éosinophiles, les macrophages et les lymphocytes T (LT) peuvent également participer à la réaction inflammatoire en libérant du TNF- α (*Tumor Necrosis Factor-alpha*). La production de petits médiateurs protéiques pro-inflammatoires comme les endothélines, par les cellules endothéliales, va être augmentée. Les endothélines vont engendrer une réaction de bronchoconstriction et de vasoconstriction, une hyperplasie des muscles lisses, une hypersécrétion de mucus et la production de monoxyde d'azote (NO) par deux enzymes : la NOS (*Nitric Oxide Synthase*) et la iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*) par les cellules épithéliales et les macrophages, respectivement (Barnes, 2004a,b). Les réactions d'exacerbation d'asthme sont marquées par le recrutement massif de neutrophiles qui vont jouer un rôle important dans la modulation de la réaction inflammatoire (Barnes, 2008a).

2. Les broncho-pneumopathies chroniques obstructives (BPCO)

Les BPCO sont un problème majeur de santé public dans le monde. Cette maladie représentera en 2020 la 3ème cause de décès dans le monde et la 5ème de morbidité par l'incapacité qu'elle induit, compte tenu de l'aggravation de l'épidémie tabagique et du vieillissement de la population mondiale. La définition d'une BPCO est, selon le GOLD (*Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease*), une pathologie chronique caractérisée par une réduction des débits respiratoires non réversible. La réduction des débits respiratoires est en général progressive et associée à une réponse inflammatoire anormale des poumons à des particules, des gaz toxiques inhalés et parfois à des prédispositions génétiques. Bien que la fumée de cigarette et les toxines bactériennes soient le plus souvent associées au développement des BPCO, la déficience en α 1-PI (*alpha1-Proteinase Inhibitor*), qui est l'inhibiteur principal de l'HNE *in vivo*, prédispose les patients à la formation de cette pathologie (Eriksson, 1964 ; Hutchison, 1973). La fumée de cigarette et les toxines vont être à l'origine de l'activation des cellules épithéliales pulmonaires et des macrophages alvéolaires qui vont sécréter différents médiateurs de l'inflammation (de Boer *et al.*, 2007a ; b). Ce sont ces médiateurs qui vont organiser le recrutement et l'activation des cellules de l'immunité comme les neutrophiles (Stockley, 2002). La régulation de la réaction inflammatoire dans les BPCO est complexe et encore mal comprise (Sabroe *et al.*, 2007a, b).

Bien que l'asthme et les BPCO soient deux pathologies pulmonaires inflammatoires, elles vont se différencier par l'implication des cellules de l'immunité, les zones pulmonaires touchées et la réversibilité ou non, de la pathologie (Figure 1).

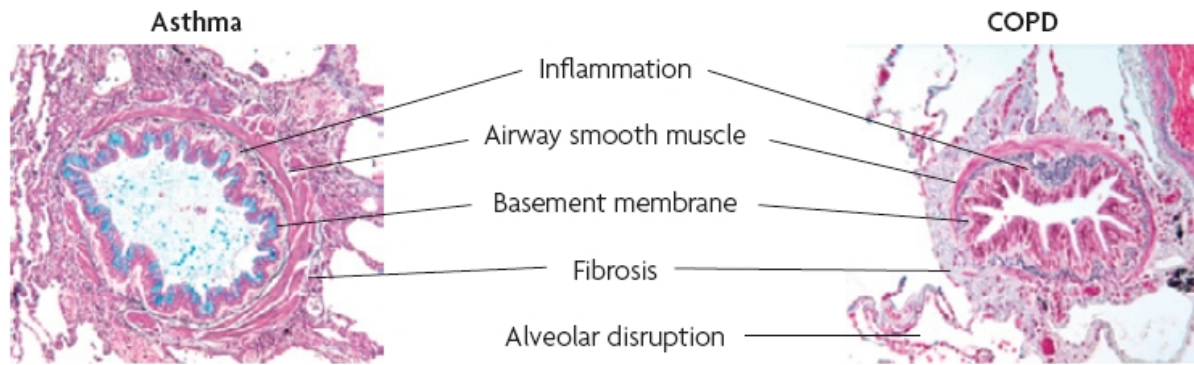


Figure 1 : Coupes histologiques de bronches de patients atteints d'asthme (asthma) et de BPCO (COPD). Dans les deux pathologies, on retrouve une réaction inflammatoire importante qui ne fait pas intervenir les mêmes cellules (mastocytes et éosinophiles pour l'asthme, neutrophiles pour la BPCO). En ce qui concerne l'asthme, il y a un épaissement de la couche des cellules des muscles lisses et de la membrane basale (fibrose sous-épithéliale) et le parenchyme pulmonaire est intact. En revanche, pour la BPCO, la couche des cellules des muscles lisses n'est pas épaissie, il y a un dépôt de collagène péri-bronchique (fibrose péri-bronchique) et une destruction de la paroi des alvéoles pulmonaires (emphysème). *Airway smooth muscle* : muscle lisse bronchique, *Basement membrane* : membrane basale, *Fibrosis* : fibrose et *Alveolar disruption* : destruction des parois alvéolaires (image du Dr. J Hogg) (D'après Barnes, 2008a).

Les BPCO sont caractérisées par une inflammation chronique pulmonaire et notamment bronchique touchant également le parenchyme pulmonaire. Il existe une accumulation de macrophages, de lymphocytes T (de façon prédominante, les LT CD8⁺) et de neutrophiles. Ces cellules activées libèrent une variété de médiateurs inflammatoires comprenant des médiateurs lipidiques comme le leukotriène B4 (LTB4), des chimiokines comme l'interleukine-8 (IL-8), des cytokines comme le TNF- α , des facteurs de croissance comme le TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) et des protéases, essentiellement celles des neutrophiles (NSPs et MMPs), qui sont capables de léser les structures pulmonaires et/ou de maintenir l'état inflammatoire. Le déséquilibre de la balance protéases/anti-protéases (Abboud et Vimalanathan, 2008) et le stress oxydatif (Mak, 2008) participent au maintien de l'état inflammatoire dans cette pathologie.

Dans l'évolution de la pathologie, des modifications anatomopathologiques caractéristiques peuvent être observées comme l'hypersécrétion de mucus, le dysfonctionnement ciliaire, la limitation des débits expiratoires, l'inflammation pulmonaire, les anomalies des échanges gazeux et l'hypertension pulmonaire. L'hypersécrétion de mucus et la dysfonction ciliaire sont responsables de la toux et de l'expectoration chronique. La limitation des débits expiratoires est responsable de la dyspnée. Cette dyspnée est liée à

l'obstruction des voies aériennes supérieures, au processus de fibrose des petites voies aériennes et à l'apparition d'un emphysème (Taraseviciene-Stewart et Voelkel, 2008) qui correspond à la destruction des parois alvéolaires et du parenchyme pulmonaire (Barnes, 2008a) (Figures 2 et 3).

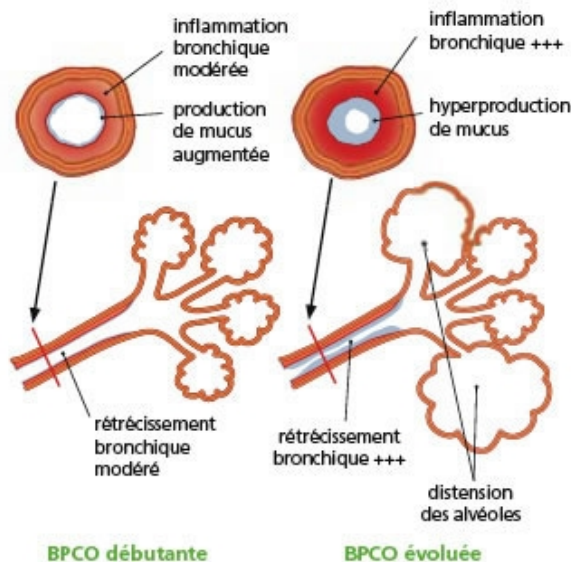


Figure 2 : Représentation schématique des bronches et des alvéoles chez un patient atteint de BPCO débutante et évoluée. L'inflammation, la production de mucus (obstruction) et la destruction des alvéoles (emphysème) conduisent au rétrécissement bronchique et à la diminution des capacités respiratoires du patient. D'après le site <http://www.arreter.fr>.

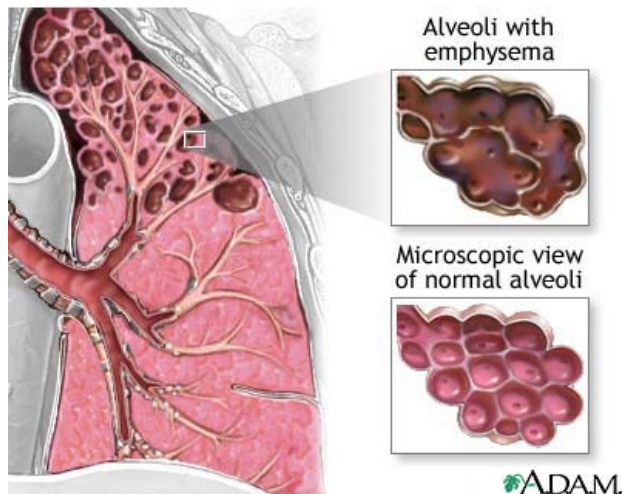


Figure 3 : Comparaison de la structure des alvéoles d'un patient sain et d'un patient atteint d'emphysème pulmonaire. Il y a une destruction de la paroi des alvéoles chez les patients atteints d'emphysème qui conduit à la limitation des débits respiratoires et des échanges gazeux. D'après le site <http://www.clarian.org>.

Comme le montre la figure 4, les macrophages et les neutrophiles sont les acteurs majeurs dans la réaction inflammatoire en particulier grâce à la libération de protéases comme les MMPs et les NSPs.

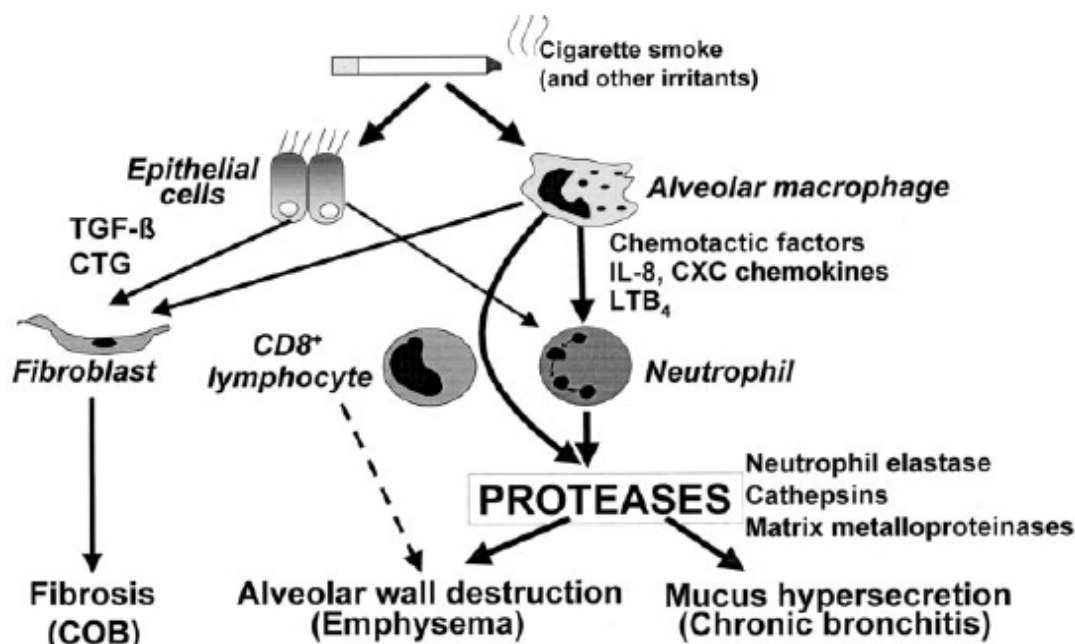


Figure 4 : Mécanismes inflammatoires dans les BPCO. CTG : Connective Tissue Growth Factor. COB : Chronic Obstructive Bronchiolitis. (D'après Barnes, 2004b).

3. La mucoviscidose

La mucoviscidose (pour *mucus* et *viscosité*) ou fibrose kystique du pancréas (*Cystic Fibrosis*), est une maladie génétique touchant l'ensemble des organes revêtus d'un épithélium glandulaire. C'est une maladie génétique létale à transmission autosomique récessive, la plus fréquente dans les populations de type caucasienne. Elle est liée à des mutations du gène *CFTR* sur le chromosome 7, entraînant une altération fonctionnelle de la protéine CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*). La mutation la plus fréquente est la mutation delta F508 ($\Delta F508$) qui consiste en une délétion de trois nucléotides au niveau du dixième exon du gène, aboutissant à l'élimination d'un acide aminé, la phénylalanine (Phe), en position 508.

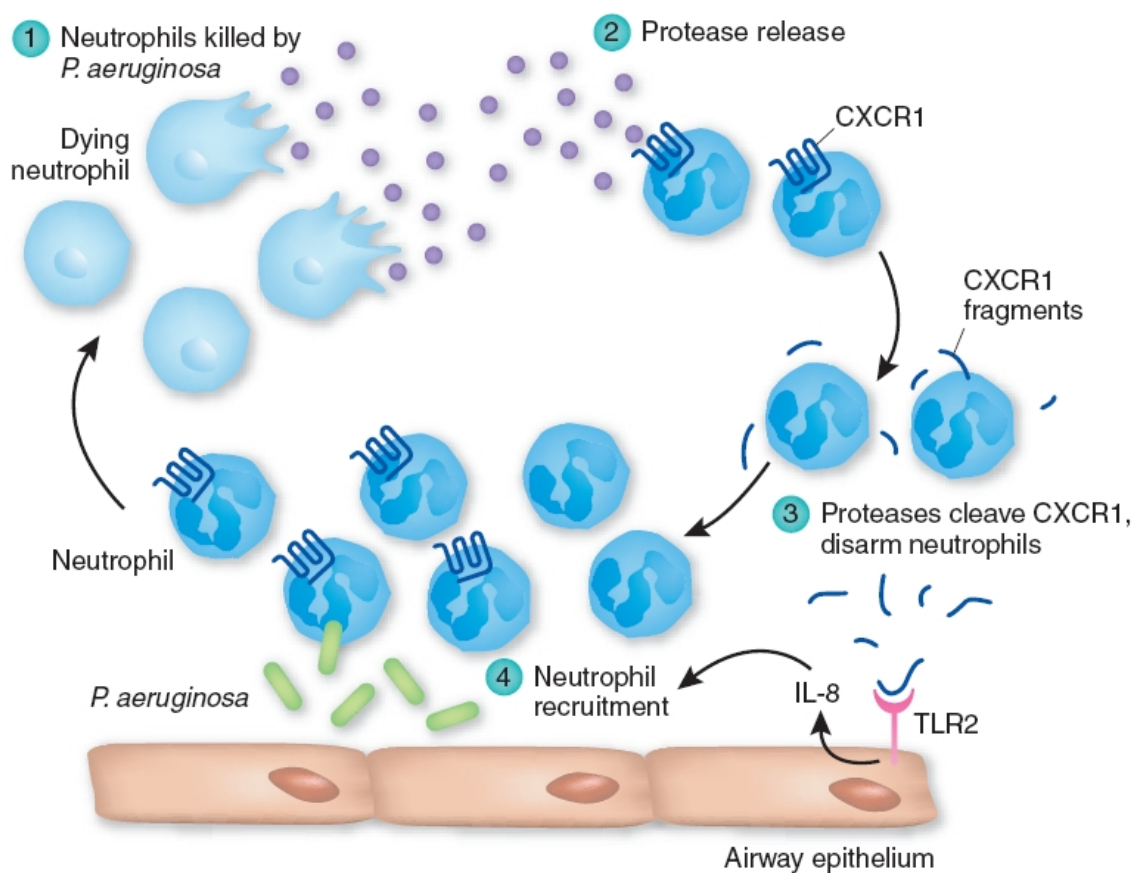
Le CFTR est une protéine membranaire de 1480 acides aminés (170 kDa), située au pôle apical des cellules épithéliales, qui se comporte comme un canal ionique laissant passer l'ion chlorure de l'intérieur des cellules vers l'extérieur. Outre sa fonction de canal chlorure, le CFTR régule également d'autres canaux comme le canal sodique épithélial et différents canaux potassiques. D'autres fonctions sans rapport avec la régulation des canaux ont aussi été décrites comme le transport d'ATP, la modulation des phénomènes d'exocytose et endocytose cellulaire et la régulation du pH des organelles intracellulaires. Le CFTR, comme les autres canaux transporteurs de chlorure est une protéine multi-fonctionnelle (Jentsch *et al.*, 2002).

La forme clinique la plus fréquente de la mucoviscidose associe aux troubles respiratoires, des problèmes digestifs et de croissance. Les manifestations pulmonaires restent

la cause majeure de la morbidité et de la mortalité. Le non fonctionnement du canal CFTR va entraîner une déshydratation du mucus à l'origine des altérations sévères et précoces de la clairance mucociliaire, une hyperplasie des glandes séromuqueuses et la formation de bouchons de mucus dans les voies aériennes. De plus, ces conditions pathologiques sont favorables à une colonisation bactérienne. Cette inflammation chronique des bronches, due à une forte concentration en molécules chimioattractantes pour les neutrophiles (Mackerness *et al.*, 2008), est à l'origine de la dégradation des fonctions pulmonaires (Elizur *et al.*, 2008).

L'état inflammatoire permanent peut s'expliquer de plusieurs façons : soit par les phénotypes différents des neutrophiles et des cellules épithéliales de patients atteints de mucoviscidose comparés à ceux de patients sains, soit par l'infection bactérienne chronique. La résolution de l'inflammation s'effectue normalement par l'élimination des cellules de l'inflammation et des cellules épithéliales apoptotiques, sous le contrôle de cytokines comme le TNF- α , par les phagocytes (macrophages et neutrophiles). Une étude récente a montré que les neutrophiles des patients atteints de mucoviscidose sont plus résistants à l'apoptose, ce qui va retarder leur élimination (McKeon *et al.*, 2008). Il semblerait également que les neutrophiles des patients atteints de mucoviscidose recrutés au niveau pulmonaire changent de phénotype par rapport aux neutrophiles circulants (Tirouvanziam *et al.*, 2008). De plus, Maiuri *et al.* ont montré que les cellules épithéliales bronchiques avec le phénotype mucoviscidose expriment plus de transglutaminase (TGase) intracellulaire de type 2, enzyme capable de séquestrer le PPAR γ (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma*) dans le cytoplasme. Le PPAR γ est un facteur de transcription qui régule la production des cytokines pro-inflammatoires. L'activité anti-inflammatoire du PPAR γ est inhibée dans ces cellules, leurs conférant ainsi un profil pro-inflammatoire (Maiuri *et al.*, 2008). L'excès de production de mucus et le non fonctionnement de la clairance mucociliaire sont à l'origine des prédispositions aux infections bactériennes. Les infections bactériennes vont favoriser le déclenchement du processus inflammatoire. Les premiers germes colonisant les voies aériennes sont *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), puis *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) à un stade plus avancé de la maladie (Campodonico *et al.*, 2008). Des études récentes ont permis d'expliquer la persistance des infections à *P. aeruginosa*, malgré le recrutement massif des neutrophiles au niveau pulmonaire, chez les patients atteints de mucoviscidose (Hartl *et al.*, 2007 ; Sabroe et Whyte, 2007b) (Figure 5). Il a été montré que lors d'une infection à *P. aeruginosa*, les neutrophiles recrutés sont capables de phagocyter les pathogènes. Après cette étape **(1)**, s'ils ne sont pas éliminés rapidement par les macrophages, ils deviennent nécrotiques et libèrent le contenu de

leurs granules, en particulier les NSPs (2). Les NSPs vont dégrader les tissus environnants et vont pouvoir cliver un des deux récepteurs de l'IL-8, le CXCR1, à la surface des neutrophiles (3). Le clivage de ce récepteur va diminuer la réponse anti-bactérienne des neutrophiles en réponse à l'IL-8. De plus, les fragments glycosylés issus de la protéolyse de ce récepteur vont être capables d'activer les cellules épithéliales via le TLR2 (4), ce qui entraîne une libération d'IL-8 et le recrutement de neutrophiles. Le résultat final est une dérégulation chronique de la réponse inflammatoire au cours de laquelle les bactéries comme *P. aeruginosa* sont capables de survivre. L'utilisation d'inhibiteurs des NSPs dans les pathologies inflammatoires comme la mucoviscidose permettrait de contrôler le processus inflammatoire (Griese *et al.*, 2008).



Kim Caesar

Figure 5 : Perturbation de la défense immunitaire innée vis-à-vis de *P. aeruginosa* chez les patients atteints de mucoviscidose. (D'après Sabroe et Whyte, 2008).

B. Les insuffisances respiratoires aiguës

1. Les exacerbations de BPCO

Les exacerbations sont définies par les experts du GOLD comme une modification des symptômes respiratoires chez des patients atteints de BPCO (dyspnée, expectoration et toux)

plus importante que les variations quotidiennes habituelles, d'installation rapide et pouvant nécessiter une modification du traitement de fond.

Ces exacerbations sont des aggravations temporaires, qualitatives et quantitatives de l'inflammation chronique des voies aériennes attribuées aux microorganismes (bactéries et virus) et aux facteurs environnementaux comme la fumée de cigarette, les gaz, la pollution atmosphérique et/ou domestique (Lemarié, 2008).

Les microorganismes les plus fréquemment associés aux exacerbations sont les rhinovirus (Traves et Proud, 2007) et les bactéries comme *H. influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) et *Branhamella* (ou *Moraxella*) *catarrhalis* (*B. catarrhalis*) (Murphy, 2006 ; Lode *et al.*, 2007). Les exacerbations d'origine virale sont plus sévères et se prolongent davantage que celles d'origines bactériennes. Les co-infections virales et bactériennes sont de plus en plus rencontrées (Papi *et al.*, 2006a).

Le recrutement des neutrophiles et des éosinophiles, au cours des phases d'exacerbation, est à l'origine de fortes réactions inflammatoires. La libération de cytokines (TNF- α), de chimiokines (IL-8), d'oxydants et de protéases en particulier des NSPs, au niveau pulmonaire va installer la réaction inflammatoire, augmenter la production de mucus et la destruction du tissu pulmonaire altérant les fonctions pulmonaires jusqu'à l'incapacité respiratoire (Papi *et al.*, 2006b).

2. Le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA)

Le SDRA a été initialement défini par la présence d'un œdème pulmonaire lésionnel associé à des opacités alvéolaires bilatérales, extensives et à une diminution de la compliance pulmonaire, responsable d'une hypoxémie sévère, mal corrigée par l'administration d'oxygène. Le SDRA est la forme la plus sévère des pathologies regroupées sous le terme d'« agression pulmonaire aiguë » ou ALI (*Acute Lung Injury*). L'ALI est une inflammation pulmonaire aiguë et persistante associée à une augmentation de la perméabilité vasculaire. D'un point de vue biologique, le SDRA est une pathologie complexe caractérisée par la diminution de la production des protéines de surfactants, le recrutement massif de macrophages et de neutrophiles, la production et la libération excessive de cytokines (TNF- α et l'IL-6) et de chimiokines (IL-8), d'oxydants et de protéases impliquées dans le remaniement de la matrice extracellulaire (emphysème) (Sabroe et Whyte, 2007b). Cette pathologie est également caractérisée par la production et le dépôt de collagène de type III, la prolifération et l'invasion des fibroblastes au niveau des alvéoles pulmonaires (fibrose). Comme pour les BPCO, il y a une co-existence de deux processus opposés, emphysème et

fibrose. Ces différents processus vont entraîner cet état inflammatoire et la destruction du tissu pulmonaire altérant les fonctions pulmonaires jusqu'à l'hypoxémie (Chang *et al.*, 2008 ; Lemarié, 2008). La cause de décès la plus fréquente chez les patients atteints de SDRA n'est pas l'hypoxémie mais la défaillance multiviscérale associée à la pathologie (Stapleton *et al.*, 2005).

C. Autres pathologies

Il existe d'autres pathologies pulmonaires inflammatoires comme la fibrose pulmonaire et les infections microbiennes.

1. La fibrose pulmonaire

La fibrose pulmonaire présente une composante inflammatoire. Elle fait partie des pneumopathies interstitielles. Elle se caractérise par un dépôt excessif de collagène et de fibrine au niveau des alvéoles et du tissu interstitiel pulmonaire, qui vont former des cicatrices fibreuses. Ce processus fibrosant est médié par le recrutement de leucocytes et la libération de protéases, la production de cytokines (TNF- α), de chimiokines (IL-8) et de facteurs de croissance (TGF- β). Les fibroblastes jouent un rôle important dans cette pathologie. On trouve différentes formes de cette pathologie qui peuvent être bénignes et d'autres plus invalidantes. Elles peuvent évoluer rapidement jusqu'à induire l'incapacité totale et la mort. Elles peuvent être de causes inconnues, on parle alors de fibroses pulmonaires idiopathiques.

2. Les infections microbiennes

Les poumons inhalent constamment des microorganismes qui peuvent être à l'origine de pathologies infectieuses graves pouvant causer la mort.

Les bronchites aiguës se définissent comme une inflammation des bronches et des bronchioles survenant chez un patient sain indemne de bronchite chronique. Ces bronchites sont essentiellement provoquées par des virus respiratoires comme le virus respiratoire syncytial (VRS) et les rhinovirus. Les pneumonies se définissent comme une infection du parenchyme pulmonaire d'évolution aiguë. *S. pneumoniae* est le pathogène le plus rencontré lors de pneumonies ainsi que les bactéries du genre *Legionella* et *S. aureus* (Lemarié, 2008). Les infections vont être plus ou moins graves selon la virulence de la souche impliquée, la prise en charge et la santé du patient. Dans certains cas, les patients peuvent aller jusqu'au stade le plus grave de l'infection qui est la septicémie et le dysfonctionnement multiviscéral.

La septicémie est l'association d'une bactériémie et d'un syndrome de réponse inflammatoire systémique (Tsai et Grayson, 2008). Les patients immunodéprimés, lors d'un traitement par chimiothérapie par exemple, seront plus sensibles aux infections par *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) (Maschmeyer *et al.*, 2008).

Ces infections vont activer la réponse immunitaire innée puis adaptative et engendrer une réaction inflammatoire essentielle pour l'élimination des pathogènes mais qui peut devenir néfaste si cette réponse n'est pas régulée.

III. Défense anti-microbienne de l'appareil respiratoire et réaction inflammatoire

Les voies respiratoires supérieures et inférieures représentent la plus grande surface épithéliale de l'organisme exposée à l'environnement extérieur. L'air inspiré est source d'oxygène, nécessaire pour l'organisme, mais aussi de particules toxiques, de gaz et de microorganismes. Les échanges gazeux doivent être maintenus malgré la présence de ces différents agents, c'est pourquoi les poumons ont développé un système de défense puissant, des narines jusqu'aux alvéoles pulmonaires. On peut séparer ce système en deux parties : la défense des voies aériennes supérieures et des bronches puis la défense au niveau des alvéoles pulmonaires (Nicod, 1999).

A. La défense des voies aériennes supérieures et des bronches

1. Les barrières anatomiques

La première barrière anatomique rencontrée est la barrière naso-pharyngienne. Cette barrière permet de limiter l'entrée de particules supérieures à 3 μm dans les voies aériennes inférieures. La plupart des grosses particules vont s'impacter au niveau de la muqueuse nasale dans laquelle on retrouve de nombreux peptides antibactériens. Les particules qui vont passer cette barrière vont pouvoir être éliminées par la toux. La toux est une expiration forcée qui va permettre l'élimination de débris cellulaires et de mucus infecté situés dans les bronches et la trachée.

2. L'appareil mucociliaire

90% des particules de taille inférieure à 2-3 μm vont venir s'impacter sur la couche de mucus qui recouvre l'épithélium pulmonaire cilié. Ces particules sont transportées des bronchioles à la trachée grâce aux battements des cils (200 à 300 par cellule ciliée). Cette

remontée s'effectue à des vitesses de 100 à 300 $\mu\text{m.s}^{-1}$. Le mucus est essentiellement composé de mucines, qui sont des glycoprotéines produites par les cellules épithéliales caliciformes (*goblet cells*) et les glandes séreuses et muqueuses (Figure 6). Le mucus va piéger les microorganismes et inhiber leur croissance mais dans certaines conditions, ils vont pouvoir continuer à se développer.

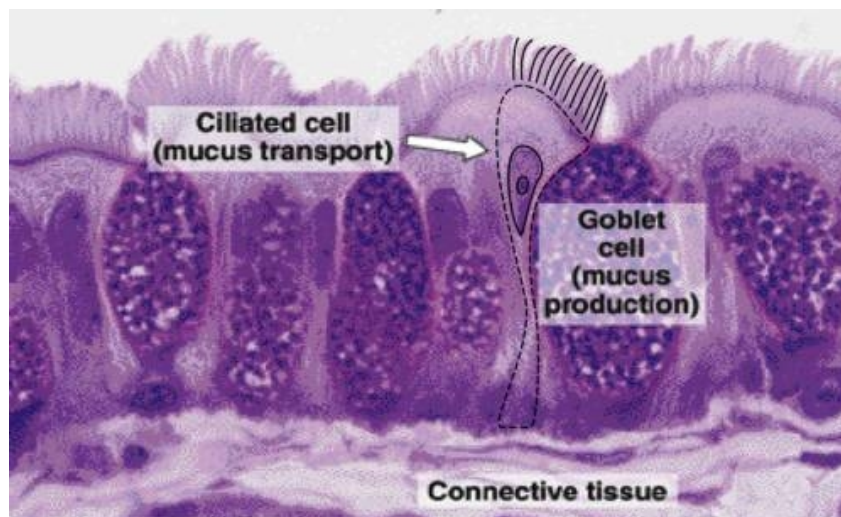


Figure 6 : Organisation de l'épithélium bronchique. Les cils des cellules ciliées vont transporter les particules des bronchioles à la trachée. Les cellules caliciformes (*goblet cells*) vont produire le mucus, nécessaire pour piéger les microorganismes. Au niveau de la membrane basale (connective tissue) se trouvent des cellules épithéliales qui peuvent se différencier soit en cellules ciliées ou en cellules caliciformes. D'après le site <http://www.mc.vanderbilt.edu>.

Pour détruire les microorganismes, le mucus comporte également des IgA (Immunoglobuline A) sécrétoires, du lysozyme, de la lactoferrine et des peroxydases. Les peroxydases sécrétées comme la lactoperoxydase, peuvent réagir avec les ions thiocyanates pour former des RNS (*Reactive Nitrogen Species*) ou produire des ROS (*Reactive Oxygen Species*) aux activités bactériostatiques ou bactéricides. La clairance mucociliaire peut être altérée par des produits bactériens comme l'élastase de *P. aeruginosa* (Wilson *et al.*, 1987).

3. L'épithélium bronchique

Les cellules épithéliales vont être liées entre elles de façon à séparer la partie luminale du parenchyme pulmonaire. Elles sont liées via des interactions cellules-cellules comme des jonctions gap, des jonctions intermédiaires et serrées ainsi que des desmosomes. Ces cellules vont sécréter un grand nombre de cytokines et de peptides antibactériens de façon à réguler l'inflammation. Parmi les cytokines, on retrouve l'IL-1 β et le TNF- α , les chimiokines IL-8 et

ENA-78 (*Epithelial cell-derived Neutrophil-Activating peptide-78 kDa*), qui sont de puissants chimioattractants pour les neutrophiles et des facteurs de croissance hématopoïétique comme le GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony-Stimulating Factor*), important pour la survie des granulocytes mais également pour le recrutement des cellules dendritiques et des macrophages. La fumée de cigarette, les toxines bactériennes et d'autres cytokines comme l'INF- γ (Interféron- γ) peuvent induire la synthèse d'IL-8 (Bedard *et al.*, 1993 ; Massion *et al.*, 1994 ; Choi *et al.*, 1992 et Schulz *et al.*, 2004).

Comme les cellules de l'immunité, les cellules épithéliales vont pouvoir détecter les intrusions bactériennes, fongiques ou virales dans notre organisme. En effet, elles possèdent différents récepteurs appelés PRRs (*Pattern-Recognition Receptors*) qui sont situés soit à la surface des cellules (épithéliales et immunitaires) ou alors dans le cytosol de ces mêmes cellules au niveau des lysosomes et des endosomes. Parmi ces PRRs, on retrouve les TLRs (*Toll-Like Receptors*) et les NLRs (*Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptors*). Les TLRs et les NLRs sont complémentaires pour la reconnaissance des pathogènes et l'organisation de la réponse immunitaire au niveau de l'épithélium. Ces récepteurs vont reconnaître différents « motifs moléculaires » associés aux pathogènes ou PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Patterns*). Parmi ces PAMPs, on trouve le LPS (*LipoPolySaccharide*) des bactéries à Gram négatif, l'acide lipotéichoïque ou LTA (*LipoTeichoic Acid*) des bactéries à Gram positif, les peptidoglycanes, les lipopeptides, l'ADN bactérien, les oses de surface (levures et moisissures) et l'ARN double brin viral.

- Les récepteurs Toll-like (TLRs) (Delneste *et al.*, 2007 ; Krishnan *et al.*, 2007 ; Akira *et al.*, 2006)

Les récepteurs *Toll* ont d'abord été décrits comme jouant un rôle dans l'immunité de la drosophile (Lemaitre *et al.*, 1996) puis ont été découverts chez l'homme et appelés TLRs (Medzhitov *et al.*, 1997). L'activation de ces TLRs, situés soit au niveau de la surface cellulaire ou dans le cytosol, par les différents PAMPs va entraîner une réponse anti-microbienne et inflammatoire. Des cytokines et des peptides antibactériens vont être libérés comme le lysozyme, les défensines, le SLPI (*Secretory Leukocyte Protease Inhibitor*) et l'élaïne qui sont également des inhibiteurs de protéases à sérine de neutrophiles et la lactoferrine (Vos *et al.*, 2005). Les propriétés anti-microbiennes de ces petites protéines seront décrites par la suite.

A ce jour, 10 TLRs ont été identifiés chez l'homme et 13 chez la souris. Ces récepteurs sont constitués de motifs riches en leucine appelés LRR pour *Leucin Rich Repeats*,

motif que l'on retrouve également dans le récepteur au LPS, le CD14, un domaine intracellulaire proche du récepteur de l'IL-1 appelé TIR pour *Toll/IL1 Receptor*. L'activation des TLRs par leurs différents agonistes (Tableau I) va entraîner une cascade de signalisation intracellulaire aboutissant à l'activation de facteurs de transcription comme le NF- κ B, AP-1 et les facteurs de transcription IRF (*Interferon Regulatory Factor*) 3, 5 et 7 et la production de cytokines et de chimiokines pro-inflammatoires comme le TNF- α , l'IL-8 et les interférons α et β . Les cascades de signalisation sont dépendantes (TLR1, 2, 4, 5, 6, 7, 8 et 9) ou non (TLR3 et 10) du recrutement de la molécule adaptatrice MyD88 (*Myeloid Differentiation primary response gene 88*) qui va ensuite permettre le recrutement et l'activation de kinases appelées IRAK (*Interleukin 1-Associated Kinase*) 1 à 4, elles mêmes responsables de l'activation de la molécule TRAF6 (*Tumor Necrosis Factor-Associated Factor 6*), principal activateur de la voie des MAP Kinases et du NF- κ B. Dans la voie indépendante de MyD88 (TLR3), c'est une molécule appelée TRIF (*TIR domain-containing adapter protein inducing IFN β*) qui est nécessaire à l'activation du facteur de transcription IRF3. Le TLR4 utilise les deux voies d'activation possible.

Famille	Localisation	Agonistes microbiens
TLR1 (+TLR2)	Surface cellulaire	Triacyl lipopeptide (bactéries, mycobactéries)
TLR2	Surface cellulaire	Lipopeptides/lipoprotéines (nombreux pathogènes) Peptidoglycane et acide lipotéichoïque (bactéries à Gram positif), lipoarabinomannanes (mycobactéries) OmpA (bactérie à Gram négatif)
TLR3	Intracellulaire	ARN double brin (virus)
TLR4	Surface cellulaire	Lipopolysaccharides (bactéries à Gram négatif) Protéines virales et parasitaires
TLR5	Surface cellulaire	Flagelline (bactéries)
TLR6 (+TLR2)	Surface cellulaire	Diacyl lipopeptide (mycoplasmes)
TLR7	Intracellulaire	ARN simple brin (virus)
TLR8	Intracellulaire	ARN simple brin (virus)
TLR9	Intracellulaire	ADN hypométhylé (bactéries)
TLR10	Surface cellulaire	?

Tableau I : Localisation et ligands microbiens des 10 TLRs humains. D'après Delneste *et al.*, 2007.

Il est à noter que la distribution cellulaire des TLRs est associée à la nature des ligands qu'ils reconnaissent, plutôt qu'à une similitude de leurs séquences et de leurs structures. Les TLR1, 2, 4, 5 et 6, spécialisés dans la reconnaissance de composés microbiens, sont exprimés à la surface des cellules. A l'inverse, les TLR3, 7, 8 et 9, spécialisés dans la détection des acides nucléiques microbiens, sont localisés au niveau des endosomes et lysosomes.

- Les NLRs (Franchi *et al.*, 2006, Martinon et Tschopp, 2005 et Sutterwala *et al.*, 2007)

Les NLRs sont des récepteurs strictement intracellulaires qui, comme les TLRs, vont reconnaître différents motifs microbiens grâce à leurs motifs LRR. Leur activation va entraîner une cascade de signalisation intracellulaire conduisant à la libération de médiateurs pro-inflammatoires impliqués dans la défense anti-microbienne. Les NLRs, Nod (*Nucleotide-Binding Oligomerization*) 1 et 2, reconnaissent des éléments du peptidoglycane des bactéries. Leur activation va entraîner leur oligomérisation et l'activation du NF- κ B et des MAP kinases Jnk, p38 et Erk aboutissant ainsi à la libération de cytokines et de chimiokines comme le TNF- α et l'IL-8 ainsi que la production d'oxydants et l'expression de molécules d'adhésion cellulaire, à la surface de l'épithélium, pour faciliter le recrutement des cellules de l'immunité. D'autres NLRs comme Ipaf et NALP3 (cryopyrin) vont reconnaître d'autres éléments microbiens. En effet, Ipaf reconnaît la flagelline et NALP3 reconnaît l'ARN bactérien mais également les molécules endogènes de « danger » comme les cristaux d'urate de sodium ou de phosphate de calcium. L'activation de ces deux NLRs entraîne l'activation de caspases, enzymes impliquées dans la mort cellulaire, et en particulier de la caspase 1 qui est responsable de la maturation de l'IL-1 β et l'IL-18, deux cytokines pro-inflammatoires. Ces deux cytokines libérées vont se fixer sur leurs récepteurs respectifs l'IL-1R et l'IL-18R qui sont structuralement identiques aux TLRs. Ces deux récepteurs partagent également un domaine TIR et utilisent la molécule adaptatrice MyD88 pour activer le NF- κ B. Ces deux NLRs peuvent s'organiser en une structure formée de complexes multiprotéiques d'environ 700 kDa appelée inflammasome.

Le recrutement des cellules de l'inflammation comme les neutrophiles sera facilité par la surexpression, en réponse à l'activation des PRRs comme les TLRs et les NLRs, de molécules d'adhésion cellulaire comme les ICAM (*InterCellular Adhesion Molecule-1*) et de molécules chimioattractantes. De plus, en réponse à l'INF- γ , les cellules épithéliales sont capables d'exprimer les molécules du CMH (*Complexe Majeur d'Histocompatibilité*) de classe I et II qui vont permettre de présenter les antigènes aux LT et ainsi d'orienter la réponse immunitaire adaptative (Rossi *et al.*, 1990).

4. Les IgA

Ces immunoglobulines représentent la première ligne de défense qui n'est plus innée mais adaptative. Les IgA sont synthétisées dans la *lamina propria* (zone qui sert de base aux cellules épithéliales) et sont sécrétées sous forme de dimères associés par une pièce J (synthétisée par les plasmocytes) de 15 kDa et le composant sécrétoire (synthétisé par les

cellules épithéliales des muqueuses). Une fois assemblé à la surface basolatérale des cellules épithéliales, le complexe appelé polyIgR va être internalisé et transporté à travers le cytoplasme jusqu'à la surface apicale des cellules puis libéré dans les voies respiratoires (Underdown et Schiff, 1986). Ces IgA vont neutraliser les toxines bactériennes, les virus, bloquer l'entrée des bactéries au niveau de l'épithélium et vont se fixer sur les bactéries (opsonisation) et ainsi améliorer leur élimination par phagocytose par les cellules dendritiques, les macrophages et les neutrophiles.

5. Les cellules dendritiques et les lymphocytes

Les cellules dendritiques sont les cellules qui vont faire le lien entre la réponse immunitaire innée et adaptative. Ces cellules expriment constitutivement le CMH de classe II, ce sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA) professionnelles car elles sont capables d'activer les LT naïfs (qui n'ont jamais vu d'antigènes). Elles sont en interaction étroite avec les cellules épithéliales et forment un réseau organisé, qui va pouvoir être rapidement activé en réponse au GM-CSF et au TNF- α . Après avoir phagocyté un antigène, elles vont activer les LT CD4⁺ et CD8⁺ par l'intermédiaire de différentes molécules de co-stimulation et la libération de cytokines. Cette activation va jouer un rôle important dans l'orientation de la réponse immunitaire soit dite « cellulaire » (Th1) qui fait essentiellement intervenir les LT CD8⁺ ou humorale (Th2) qui fait intervenir les LT CD4⁺ (production d'anticorps).

Les lymphocytes sont les cellules effectrices de l'immunité adaptative. Comme les cellules dendritiques, ils interagissent étroitement avec les cellules épithéliales. Ils sont localisés de la façon suivante : les LT CD8⁺ se trouvent généralement à la surface épithéliale, en contact direct avec les antigènes inhalés et les LT CD4⁺ se trouvent sous les cellules épithéliales, au niveau de la *lamina propria*. Les cellules dendritiques et les lymphocytes seront plus amplement décrits par la suite.

B. La défense immunitaire des alvéoles pulmonaires

Certaines particules ou des microorganismes ne vont pas se faire piéger par les mécanismes de défense des voies aériennes supérieures et vont se retrouver au niveau des alvéoles pulmonaires. Pour se défendre, l'organisme va déclencher une réaction inflammatoire visant à recruter principalement des monocytes et des neutrophiles mais également des macrophages, des lymphocytes et des éosinophiles, pour organiser une

médiation cellulaire et l'élimination des corps étrangers. Lorsque ce processus est terminé, les débris cellulaires et l'environnement pro-inflammatoire doivent être éliminés de façon à ce que les alvéoles retrouvent leur structure de départ. Les rôles de ces différentes cellules dans la réaction inflammatoire seront plus amplement détaillés dans le paragraphe suivant. Dans les alvéoles, un autre système de défense antibactérien, non spécifique, peut intervenir. Celui-ci est composé d'immunoglobulines et d'opsonines (Nicod, 1999).

Les IgG représentent 5% des protéines totales dans les LLBA (*Liquides de Lavages Bronchiolo-alvéolaires*). Ces immunoglobulines possèdent la plus forte activité d'opsonisation dans les alvéoles. Selon les pathogènes rencontrés, 4 types d'IgG seront synthétisés. L'IgG2, par exemple, est le type d'IgG qui sera synthétisé en présence des bactéries à tropisme pulmonaire *H. influenzae* et *S. pneumoniae* (Siber *et al.*, 1980).

Dans les LLBA, plusieurs composants sont capables de se lier, de façon non spécifique, aux microorganismes comme les protéines du surfactant, la fibronectine et la CRP (*C-Reactive Protein*). Ces protéines vont jouer un rôle d'opsonines « non immunes » (non professionnelles) et vont pouvoir favoriser la phagocytose des microorganismes par les macrophages et les neutrophiles qui possèdent des récepteurs membranaires pour ces différentes protéines.

Le surfactant pulmonaire est un ensemble complexe de lipides, de phospholipides et de protéines sécrétés continuellement dans la lumière alvéolaire par les pneumocytes de type 2. Son rôle principal est de réduire la tension superficielle air/liquide créée par la fine couche de liquide se trouvant à la surface des alvéoles pulmonaires, appelée ASL (*Airway Surface Liquid*). La réduction de la tension superficielle facilite l'expansion des alvéoles à l'inspiration et les maintient ouvertes pendant l'expiration. Il y a 4 protéines de surfactant. Les protéines du surfactant A et D (*SP-A* et *-D*) possèdent une activité d'opsonisation (Bufler *et al.*, 2003).

La fibronectine est une glycoprotéine d'environ 250 kDa, qui joue un rôle important dans l'adhésion des cellules à la matrice extracellulaire. Elle peut être produite par les neutrophiles qui possèdent un récepteur à cette protéine. Elle possède des propriétés chimioattractantes pour les neutrophiles et des propriétés d'opsonisation (Neese *et al.*, 1994 ; Salcedo *et al.*, 1997).

La CRP (*C-Reactive Protein*) est une protéine qui est synthétisée lors d'une réaction inflammatoire par le foie (marqueur biologique). Elle sera d'autant plus concentrée dans le sang que l'inflammation sera forte (Volanakis, 2001). Elle possède également des propriétés d'opsonisation (Casey *et al.*, 2008).

Le système du complément est une cascade biochimique complexe du système immunitaire inné, entraînant une opsonisation (C3b), une lyse des microorganismes (CAM : *Complexe d'Attaque Membranaire*), une chimiotaxie (Anaphylatoxines : C3a et C5a) et une réaction inflammatoire. Le système du complément consiste en plus de 35 protéines plasmatiques et membranaires. Parmi elles, 12 sont directement impliquées dans des voies métaboliques du complément, alors que les autres servent de régulateurs (Rus *et al.*, 2005). Après l'activation du complément, la réponse immunitaire adaptative va s'organiser. La plupart des composants du complément peuvent être produits par les macrophages alvéolaires même si ces composants sont principalement synthétisés par le foie et transportés dans les poumons par le sang. Deux éléments du complément vont jouer un rôle clé dans les alvéoles, le C3b qui va opsoniser les bactéries et permettre une meilleure phagocytose et le C5a qui est un puissant chimioattractant pour les phagocytes, en particulier les neutrophiles (DiScipio *et al.*, 2006).

IV. Les cellules de l'immunité et la réaction inflammatoire

A. Les basophiles

Les basophiles font partie de la famille des granulocytes comprenant également les éosinophiles et les neutrophiles. Ce sont des leucocytes de 12 à 14 µm de diamètre, jouant un rôle dans la réaction inflammatoire, en particulier dans l'asthme. Les basophiles sont les plus rares des leucocytes circulants (0,5%) mais ils sont avec les mastocytes, les cellules portant le plus de récepteurs membranaires aux IgE (Immunoglobulines E), immunoglobulines impliquées dans la réaction d'hypersensibilité immédiate et les chocs anaphylactiques (réactions allergiques exacerbées) lors de la fixation du complexe IgE-allergène sur le récepteur de haute affinité FcεRI (fragment Fc epsilon Receptor I) et le CD23 (Gould et Sutton, 2008). Après activation, ils vont sécréter différentes molécules, en particulier de l'histamine. L'histamine va augmenter la perméabilité des capillaires sanguins, ouvrant ainsi la voie à la diapédèse des autres cellules de l'inflammation comme les neutrophiles, les lymphocytes et vont activer le complément. Les basophiles vont plutôt orienter la réponse immunitaire vers le type Th2 (humoral). Après avoir libéré le contenu de leurs granules, les basophiles vont synthétiser de nouvelles molécules qui auront pour but de prolonger la réaction inflammatoire comme les cytokines IL-6, IL-4, INFγ et le GM-CSF qui vont stimuler l'hématopoïèse, l'activation des neutrophiles et leur recrutement. Ces cytokines vont

également activer la différenciation des lymphocytes B (LB) en plasmocytes afin d'orienter la réponse immunitaire vers une réponse de type Th2, correspondant à la production d'anticorps (Min et Paul, 2008).

B. Les mastocytes

Les mastocytes sont des cellules de 15 à 25 μm de diamètre, rondes et mononucléées. On distingue deux types de mastocytes : les mastocytes dits muqueux et ceux dits conjonctifs. Les premiers sont thymo-dépendants mais pas les seconds. Les propriétés biologiques de ces mastocytes sont sensiblement identiques. Ils sont riches en histamine, en récepteurs aux IgE, ils sécrètent de l'héparine et des chondroïtines sulfates intervenant dans le processus de coagulation mais leurs contenus diffèrent en protéases. Les mastocytes muqueux ne possèdent que la tryptase alors que les mastocytes conjonctifs possèdent la tryptase, la chymase, la cathepsine G et la carboxypeptidase A. Ils présentent des activités anti-bactériennes et anti-parasitaires. L'activité anti-bactérienne, indépendante de la phagocytose, provient de la capacité des mastocytes à former des pièges extracellulaires, les MCETs (*Mast Cell Extracellular Traps*) qui sont des pièges à bactéries composés d'ADN, d'histones, de tryptase et du peptide anti-bactérien LL-37 (von Köckritz-Blickwede *et al.*, 2008). Ces structures extracellulaires sont induites par les bactéries, l' H_2O_2 et le PMA (*Phorbol-12-Myristate-13-Acetate*) et ont déjà été décrites pour les neutrophiles (Brinkmann *et al.*, 2004). Ils vont sécréter d'autres médiateurs de l'inflammation comme du TGF- β , ce qui implique ces cellules dans les processus de cicatrisation et de fibrose, mais également de la sérotonine (neuromédiateur), des leucotriènes (leucotriène C4 : LTC4) et des prostaglandines (prostaglandine 2 : PGD2) impliqués dans la bronchoconstriction et la contraction des muscles lisses, respectivement. Ils vont libérer les mêmes cytokines (IL-4 et IL-9) que les basophiles qui vont entraîner leur auto-activation. Ces cytokines vont également favoriser le recrutement des neutrophiles, activer et orienter la réponse immunitaire vers un type humoral (Th2). Il a récemment été montré que les mastocytes pouvaient réguler l'environnement pro-inflammatoire en sécrétant de l'IL-10 qui est une puissante cytokine anti-inflammatoire, ce qui confère aux mastocytes un rôle important dans le contrôle de la réaction inflammatoire (Galli *et al.*, 2008).

C. Les éosinophiles

Les granulocytes éosinophiles, également appelés polynucléaires éosinophiles ou plus simplement éosinophiles, sont des cellules de 12 à 14 µm de diamètre, représentant 2 à 5% des leucocytes circulants. Ces cellules jouent un rôle dans l'immunité innée anti-parasitaire (anti-helminthique en particulier). Ils vont s'attaquer aux parasites de l'organisme, sans les phagocyter. Ils vont se fixer dessus et déverser le contenu de leurs granules contenant des substances toxiques : les ESPG (*Eosinophil Specific Granule Proteins*) comme les protéines MBP-1 et MBP-2 (*Major Basic Protein-1* et *-2*) et des enzymes comme l'EPO (*Eosinophil peroxidase*) qui va former des ROS en présence de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) (Wang et Slungaard, 2006) et l'ECP (*Eosinophil Cationic Protein*) qui est une RNase présentant des activités anti-parasitaires et anti-bactériennes (Venge *et al.*, 1999 ; Torrent *et al.*, 2008). Ces cellules jouent un rôle important dans le contrôle de la réaction asthmatique allergique mais aussi dans les processus inflammatoires (Jacobsen *et al.*, 2007). En effet, les éosinophiles sécrètent un grand nombre de cytokines et de chimiokines dont le GM-CSF, l'IL-3, l'IL-5 (également sécrétées par les LT) et l'éotaxine, qui vont avoir des actions autocrines sur la différenciation, la multiplication cellulaire, mais également des effets sur le recrutement des macrophages et des neutrophiles et sur l'orientation des LT vers une réponse Th1 (cytotoxique) et Th2 (humorale) (Jacobsen *et al.*, 2007 ; Palmqvist *et al.*, 2007).

D. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques, différenciées à partir des monocytes circulants, sont des cellules douées de phagocytose qui jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire. Elles vont épurer les sites inflammatoires des cellules apoptotiques et nécrotiques. Ce sont des cellules présentatrices d'antigène (CPA), capables d'activer les LT naïfs et d'orienter la réponse immunitaire vers un type cellulaire (Th1) ou humoral (Th2). Elles maintiennent également la tolérance au soi. Elles font le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Blanco *et al.*, 2008). Elles possèdent des récepteurs membranaires PRR (*Pattern recognition Receptors*) de type TLR (*Toll-Like Receptor*) et CLR (*C-type Lectin Receptor*) ainsi que des récepteurs aux IgE (van Vliet *et al.*, 2007). Les cellules dendritiques immatures, caractérisées par une forte capacité d'internalisation et une faible capacité de stimulation des lymphocytes T, sont en étroite interaction avec les voies aériennes, de la muqueuse nasale jusqu'aux alvéoles pulmonaires. Après activation (par phagocytose de l'antigène), elles vont

sécréter différentes cytokines comme l'INF γ et l'IL-6 qui orienteront essentiellement les lymphocytes vers une réponse Th1 et les cytokines IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13 vers une réponse Th2 (Deslee *et al.*, 2004). Ces cytokines vont également permettre le recrutement des neutrophiles et des macrophages. Une étude récente a montré que le nombre de cellules dendritiques était fortement diminué chez les patients atteints de BPCO, ce qui pourrait expliquer les récurrences des infections, la fréquence des exacerbations et la diminution des lymphocytes T CD8⁺ associés à la pathologie (Tsoumakidou *et al.*, 2008).

E. Les lymphocytes

Les lymphocytes sont des leucocytes très importants pour la protection de l'hôte. Il en existe trois types : les LT, les LB et lymphocytes NK (*Natural Killer*).

Les LT, également appelés thymocytes ou cellules T, jouent un rôle important dans l'immunité adaptative. "T" est l'abréviation de thymus, l'organe dans lequel leur développement s'achève. Ils sont responsables de l'immunité cellulaire : les cellules (bactéries, cellules cancéreuses) reconnues comme étrangères sont détruites par un mécanisme complexe. Il y a plusieurs types de LT :

- Les LT8 ou CD8⁺ évoluant en cellules T cytotoxiques. Ces LT CD8⁺ vont détruire les cellules infectées en libérant le contenu protéique de leurs granules composé essentiellement de la perforine (homologue de la protéine C9 du complément), qui s'insère dans la membrane plasmique et va créer des pores aboutissant à l'explosion de la cellule infectée et les granzymes, qui sont des enzymes appartenant à la famille des protéases à sérine.
- Les LT4 ou CD4⁺ peuvent évoluer en LT auxiliaires ou « Helpers » mais aussi en LT CD4⁺ cytotoxiques. Ces LT CD4⁺ sont des intermédiaires de la réponse immunitaire qui prolifèrent après contact avec l'antigène, présenté par une cellule dendritique, pour activer d'autres types cellulaires, qui agiront de manière spécifique. Les éléments qui contribuent à la différenciation des LT CD4⁺ cytotoxiques ne se distinguent pas de ceux qui contribuent à la différenciation des LT CD4⁺ auxiliaires. Ces deux types de population de CD4⁺ agissent principalement via la production et la libération de cytokines. Les cellules CD4⁺ régulent ou « aident » à la réalisation d'autres fonctions lymphocytaires. Ils vont pouvoir orienter la réponse immunitaire vers deux types de voies distinctes : Th1 et Th2 (*T helper 1* et 2).

La réponse Th1 consiste en une réponse cellulaire, vis-à-vis de pathogènes intracellulaires, qui fait intervenir les LT CD8⁺. Ces cellules vont essentiellement produire de l'IFN- γ et de l'IL-2. Les Th1 vont activer les macrophages et induire la sécrétion d'IgG.

La réponse Th2 va orienter les LT CD4⁺ vers une réponse humorale, c'est-à-dire vers l'activation de la production d'anticorps spécifiques par les lymphocytes B (IgG, IgE, IgA).

Une autre population de LT auxiliaires a récemment été décrite : les lymphocytes Th17. Ces lymphocytes produisent de l'IL-17 et semblent intervenir dans la régulation des réponses inflammatoires et dans la lutte anti-bactérienne (Weaver *et al.*, 2006). Il a été proposé que ces lymphocytes pouvaient jouer un rôle dans les BPCO (Curtis *et al.*, 2007). Les cellules dendritiques ne sont pas seulement capables de générer une réponse immune effectrice ; elles peuvent également induire une tolérance immunitaire en différenciant un LT naïf en LT régulateur (LTreg). Les LTreg aident à prévenir l'activation des lymphocytes auto-immuns qui détruisent les cellules de leur propre organisme. Il a été montré que la population de LTreg est diminuée chez les patients atteints d'emphysème pulmonaire (Lee *et al.*, 2007) et chez les patients atteints de BPCO (Barcelo *et al.*, 2008).

- Les LT NK sont des lymphocytes non B non T de grande taille qui présentent des granules intracytoplasmiques d'où leur nom de grands lymphocytes à granules ou LGL (*Large Granular Lymphocytes*). Ces NK exercent une activité cytotoxique vis-à-vis de cellules tumorales, infectées par des pathogènes intracellulaires et des virus. De plus, ils expriment des récepteurs pour le fragment Fc des immunoglobulines et de ce fait peuvent être « armés » par des anticorps pour exercer une activité cytotoxique dépendante des anticorps ou ADCC (*Antibody Dependent Cell mediated Cytotoxicity*).

Les cellules B sont des lymphocytes jouant un grand rôle dans l'immunité humorale. Ces globules blancs interviennent dans la production d'anticorps. Pour être actifs, d'autres cellules telles que les macrophages ou les cellules dendritiques, doivent leur présenter des fragments d'antigène, afin qu'ils se transforment en plasmocytes (LB activés). Il y a deux types de cellules B :

- Les plasmocytes qui produisent et secrètent des anticorps. Le complexe antigène-anticorps va être capté par les cellules phagocytaires possédant les récepteurs aux fragments Fc des anticorps. Le complexe va être ensuite internalisé puis détruit.

- Les cellules B à mémoire sont formées spécifiquement contre les antigènes rencontrés lors de la réponse immunitaire primaire; comme elles peuvent vivre longtemps, ces cellules peuvent réagir rapidement lors d'une seconde exposition à l'antigène.

Environ 10% des cellules retrouvées dans les alvéoles pulmonaires sont des lymphocytes dont 50% de LT CD4⁺, 30% de LT CD8⁺, 10-15% de NK et 5% de LB.

Les lymphocytes (B et T) activés vont libérer des cytokines et des chimiokines et ainsi créer un environnement inflammatoire qui aura pour but de recruter différentes cellules, en particulier, des macrophages, des cellules dendritiques et des lymphocytes. Il a été montré que les souris déficientes en lymphocytes T CD8⁺ exposées à la fumée de cigarette ne développaient pas d'emphysème pulmonaire, comparé aux souris C57BL/6J sauvages. Cette expérience place les LT CD8⁺ au centre de l'organisation de la réaction inflammatoire jouant un rôle important dans le recrutement des macrophages et leurs activités protéolytiques (MMP-12) dans la destruction de l'élastine (Maeno *et al.*, 2007). L'exposition des souris à la fumée de cigarette diminue la capacité des lymphocytes à sécréter de l'IL-2, ce qui diminue la prolifération des LT CD4⁺ et donc le développement de LT reconnaissant différents antigènes. Ce défaut d'activation des LT par les cellules dendritiques pourrait expliquer les prédispositions des patients atteints de BPCO aux infections et aux exacerbations (Robbins *et al.*, 2008).

F. Les macrophages

Les macrophages, comme les cellules dendritiques, sont des cellules qui se sont différenciées à partir des monocytes circulants. Les macrophages sont des grandes cellules de 30 à 60 µm de diamètre, possédant des cytoplasmes volumineux composés de nombreux lysosomes primaires et secondaires. Au niveau pulmonaire, les macrophages alvéolaires, qui sont des phagocytes, représentent 85% des cellules totales dans les LLBA. Ils vont jouer un rôle primordial dans la défense des alvéoles et dans l'initiation de la réaction inflammatoire (Figure 7).

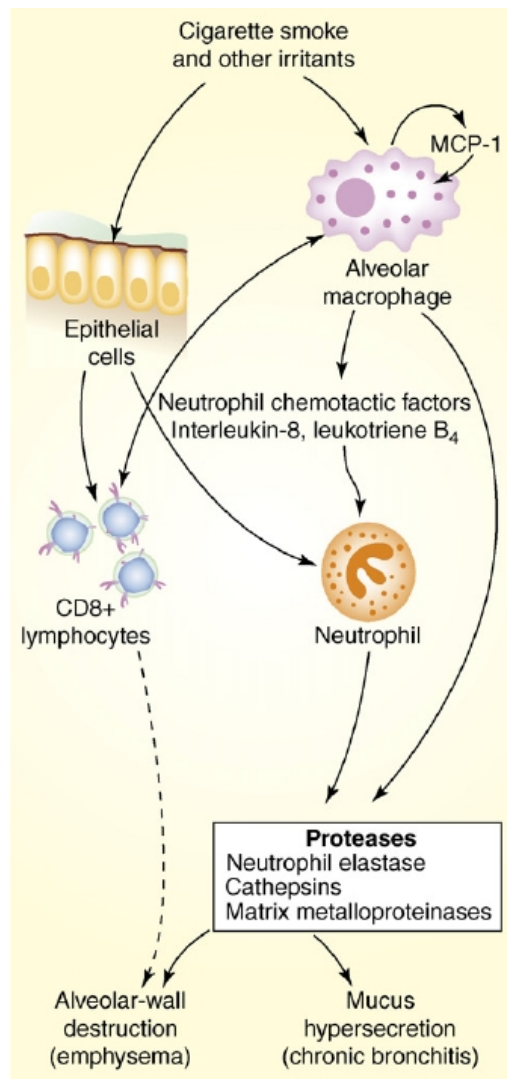


Figure 7 : Implication des macrophages dans la réaction inflammatoire. En réponse à différents stimuli, comme la fumée de cigarette, les macrophages vont libérer des médiateurs de l'inflammation comme l'IL-8 et le LTB₄ qui vont permettre le recrutement et l'activation des LT CD8⁺ et des neutrophiles. Les protéases des neutrophiles mais aussi celles des macrophages vont entraîner la destruction des parois alvéolaires (emphysème) ainsi que l'augmentation de la production de mucus (obstruction bronchique). Les cellules épithéliales participent également à l'activation des cellules de l'immunité impliquées dans la réaction inflammatoire (D'après Folkerts *et al.*, 2008).

Les macrophages peuvent libérer des peptides antibactériens comme le lysozyme et les défensines, produire des oxydants et des anti-oxydants, libérer des protéases (MMPs, protéases à cystéine et urokinase) et des cytokines. Les peptides anti-bactériens seront plus amplement décrits dans le chapitre suivant. Nous nous focaliserons, ici, sur la production d'oxydants et de cytokines qui jouent un rôle important dans les BPCO (Barnes, 2004a, b).

1. Les oxydants dérivés de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS)

Le stress oxydatif est une caractéristique des BPCO. Les oxydants peuvent provenir soit de la fumée de cigarette, de l'ozone ou des cellules de l'immunité comme les macrophages. La quantité d'oxydant produit dans les poumons, lors du stress oxydatif, va dépasser le potentiel anti-oxydant aboutissant à des effets délétères comme des dommages sur les lipides membranaires, sur les protéines ou l'ADN. Les cellules inflammatoires et épithéliales pulmonaires activées vont synthétiser des ROS et des RNS.

a. Les oxydants dérivés de l'oxygène (ROS)

Les ions superoxyde O_2^- générés par la NADPH oxydase, vont être transformés en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) par la superoxyde dismutase. L' H_2O_2 va pouvoir être dismuté en H_2O par la catalase. L' H_2O_2 et l' O_2^- peuvent interagir en présence de fer pour former le radical hydroxyl $OH^\cdot$. L' O_2^- peut se combiner avec le monoxyde d'azote ($NO^\cdot$) pour former le peroxynitrite mais aussi de l' $OH^\cdot$. Le stress oxydatif va entraîner l'oxydation de l'acide arachidonique pour former des isoprostanes qui auront plusieurs effets, en particulier la bronchoconstriction. Les ROS ont la capacité de réguler des facteurs de transcription comme le $NF-\kappa B$ et AP-1 impliqués dans le contrôle de l'expression de nombreux médiateurs pro-inflammatoires comme l'IL-8 et le $TNF-\alpha$. Les ROS peuvent également activer l'EGFR (*Epithelial Growth Factor Receptor*), récepteur impliqué dans la synthèse de mucines et la prolifération cellulaire. Les ROS inactivent les inhibiteurs des NSPs comme l' $\alpha 1$ -PI, le SLPI et l'élafine, favorisant la destruction de l'élastine dans le parenchyme pulmonaire. Les ROS activent les macrophages et les neutrophiles qui vont libérer leur contenu enzymatique dans le milieu, conduisant à une destruction des protéines de la matrice extracellulaire environnante. Les ROS peuvent induire la mort cellulaire ou apoptose des cellules épithéliales et endothéliales contribuant ainsi au développement d'un emphysème.

La production de ROS va être naturellement contrôlée par des anti-oxydants qui peuvent être enzymatiques ou non. Parmi les enzymes, les macrophages vont sécréter de la catalase et la SOD (*SuperOxide Dismutase*) ainsi que la glutathion peroxydase. Ils libèrent également du glutathion qui va leur permettre de se protéger des ROS qu'ils synthétisent.

b. Les oxydants dérivés de l'azote (RNS)

Les RNS comme le monoxyde d'azote ($NO^\cdot$) et le peroxynitrite ($NO_3^\cdot$) sont synthétisés par les macrophages par les iNOS (*inducible Nitric Oxide Synthase*). La concentration de $NO^\cdot$ va augmenter chez les patients uniquement lors de réactions d'exacerbation de BPCO. La fumée de cigarette et le stress oxydatif diminuent la concentration de $NO^\cdot$ libre car celui-ci va s'associer très rapidement avec l' O_2^- pour former le peroxynitrite ; c'est pourquoi la concentration de $NO^\cdot$ dans l'air exhalé de patients atteints de BPCO est identique à un patient sain. Les RNS vont avoir les mêmes actions délétères que les ROS. Le peroxynitrite semble induire une résistance aux corticoïdes utilisés en thérapie anti-inflammatoire. Cette résistance serait due à la nitration d'une tyrosine qui inactiverait l'enzyme HDAC2 qui est une histone déacétylase (Barnes *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2004). Le peroxynitrite active la voie des MAP kinases et induit l'apoptose des cellules épithéliales pulmonaires. L'utilisation d'inhibiteur de

iNOS en thérapie anti-inflammatoire peut être envisagée (Hansel *et al.*, 2003). Une étude récente a montré le rôle antagoniste des ces deux RNS sur l'activation des cellules endothéliales des veines pulmonaires ou PMVEC (*Pulmonary Microvascular Endothelial Cells*). Le peroxynitrite va augmenter le potentiel d'adhésion et de migration des neutrophiles au travers de ces cellules (Shelton *et al.*, 2008).

2. Les protéases

Les macrophages possèdent trois types de protéases : les métalloprotéases matricielles (MMPs), des protéases à cystéine et des protéases à sérine comme l'urokinase. Ces protéases vont être libérées lors de la réaction inflammatoire et sont impliquées dans le remodelage tissulaire.

a. Les MMPs et les TIMPs

Les MMPs sont des protéases zinc-dépendantes qui régulent la destruction de la matrice extracellulaire mais aussi la biodisponibilité des cytokines, des chimiokines et des facteurs de croissance. Ces protéases jouent un rôle certain dans les pathologies inflammatoires en général. Dans les BPCO, elles participent à l'apparition de l'emphysème. En effet, les MMPs possèdent à la fois des propriétés élastinolytiques avec l'élastase du macrophage (MMP-12), gélatinolytiques (MMP-2 et MMP-9) et collagénolytiques (MMP-1) (Le Quément *et al.*, 2008 ; Baraldo *et al.*, 2007). Une étude récente a proposé de cibler la MMP-9 en thérapie anti-inflammatoire chez des patients atteints de BPCO (Muroski *et al.*, 2008). Il a été montré que dans des LLBA de patients atteints de BPCO, la dégradation de l'élastine est essentiellement due à l'activité des NSPs à 24 heures. En revanche, à 72 heures, l'activité des NSPs diminue fortement et celle des protéases à cystéine et des MMPs, libérées par les macrophages alvéolaires reste constante, ce qui confère à ces protéases un rôle important dans la destruction du parenchyme pulmonaire (Russell *et al.*, 2002a). La dégradation des protéines du parenchyme pulmonaire par ces différentes protéases peut conduire à la libération de peptides chimioattractants pour les neutrophiles (Folkerts *et al.*, 2008, Gaggari *et al.*, 2008) (Figure 8).

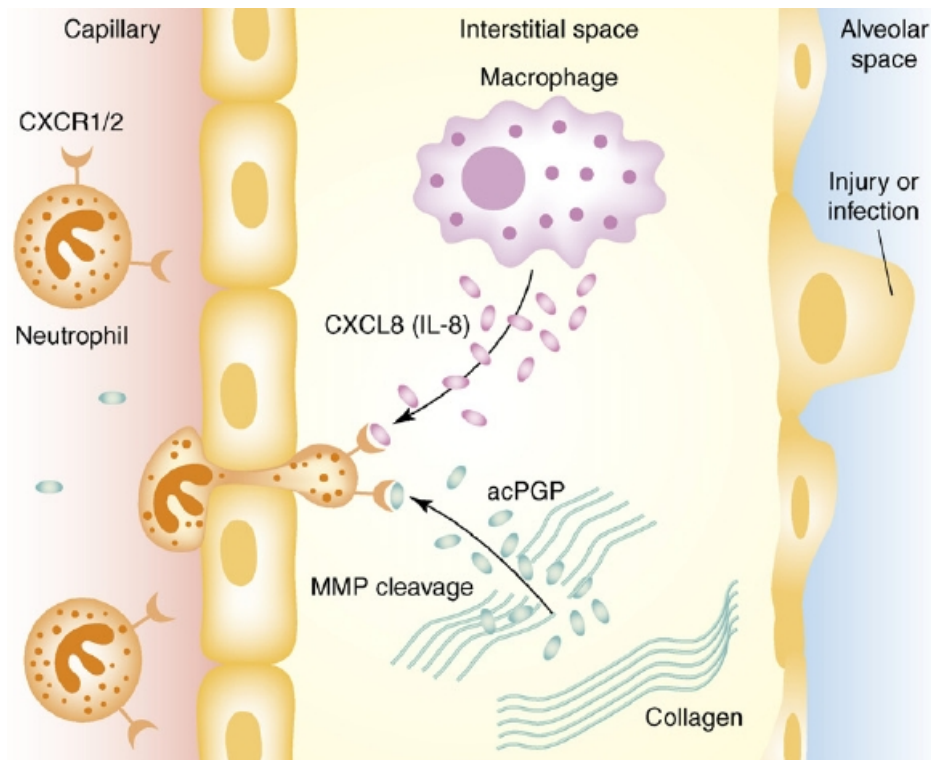


Figure 8 : Implication des MMPs dans la libération de peptides chimioattractants pour les neutrophiles. Les MMPs vont libérer des peptides issus de la dégradation du collagène. Certains de ces peptides possèdent des séquences PGP (Proline-Glycine-Proline), séquences qui permettent à ces peptides de se fixer sur les récepteurs à l'IL-8, le CXCR1 et le CXCR2. *AcPGP* : Acétyl-Proline-Glycine-Proline. Il est à noter que des peptides chimioattractants peuvent être libérés de la dégradation d'autres protéines du parenchyme pulmonaire comme l'élastine, la fibronectine et les laminines (D'après Folkerts *et al.*, 2008).

Les inhibiteurs de MMPs, appelés TIMPs (*Tissue Inhibitor of MetalloProteinase*) vont jouer un rôle important dans le contrôle de l'activité protéolytique des ces enzymes. Les macrophages alvéolaires sécrètent les TIMPs 1 et 2. Il a été montré que les macrophages issus de patients atteints de BPCO sécrètent plus de MMP-9 et moins de TIMP1 que ceux de patients sains (Russell *et al.*, 2002b ; Pons *et al.*, 2005). Comme les inhibiteurs des NSPs, les TIMPs sont inactivés par l'oxydation et par d'autres protéases comme l'HNE (Okada *et al.*, 1988 ; Stricklin et Hoidal, 1992). Un polymorphisme du gène codant pour le TIMP2 (G853A) a été associé aux BPCO chez des japonais et égyptiens (Hegab *et al.*, 2005).

b. Les protéases à cystéine et les cystatines

Les protéases à cystéine ou cathepsines à cystéine, au nombre de 11 chez l'homme, sont des protéases présentant une forte activité élastinolytique. Ce sont des enzymes d'abord décrites comme lysosomales qui sont libérées par de nombreuses cellules comme les cellules du muscle lisse et les macrophages. Ces protéases vont être surexprimées dans un modèle

d'emphysème induit par l'IL-13 (Zheng *et al.*, 2000). Trois protéases à cystéine sont responsables de 60% de l'activité élastinolytique des macrophages : les cathepsines K, S et V. Cette dernière possède l'activité élastinolytique la plus importante décrite pour les protéases humaines (Yasuda *et al.*, 2004).

Il existe 3 familles d'inhibiteurs des cathepsines à cystéine, appartenant à la superfamille des cystatines : les cystatines, les stéfines et les kininogènes. L'expression de la cystatine C par les macrophages alvéolaires est augmentée chez les patients fumeurs et chez les patients atteints de BPCO (Chapman *et al.*, 1990 ; Warfel *et al.*, 1991). Comme les autres inhibiteurs, la cystatine C peut être inactivée par l'HNE (Abrahamson *et al.*, 1991).

Lors de la réaction inflammatoire, la balance protéases/anti-protéases joue un rôle important. En effet, les activités enzymatiques non contrôlées des NSPs, des MMPs et des cathepsines à cystéine peuvent causer des dommages importants sur les tissus environnants et ainsi perpétuer l'état inflammatoire. La libération de peptides chimiotactiques de la matrice extracellulaire, par exemple, va entraîner le recrutement d'autres macrophages et des neutrophiles (Houghton *et al.*, 2006 ; Adair-Kirk et Senior, 2008).

3. Les cytokines, les chimiokines, les facteurs de croissance, les dérivés lipidiques

Les macrophages sécrètent un nombre important de cytokines, de chimiokines, de facteurs de croissance et sont à l'origine de dérivés lipidiques essentiels à l'initiation et au contrôle de la réaction inflammatoire (Nicod, 1999).

a. Les cytokines

Les principales cytokines libérées sont l'IL-1 β et son inhibiteur soluble, l'IL-1ra (ra : *Receptor Antagonist*), le TNF- α et ses inhibiteurs solubles les TNFsR55 et TNFsR75, l'IL-6, l'IL-10 et l'IL-12. Elles vont activer les cellules épithéliales et endothéliales (apparition de molécules d'adhésion cellulaire) et induire la libération de chimiokines et de facteurs de croissance. L'IL-12 va activer les macrophages et les lymphocytes de type Th1. L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire dont l'expression est fortement diminuée chez les patients asthmatiques et chez les patients atteints de BPCO (Takanashi *et al.*, 1999).

Les macrophages alvéolaires, activés par le LPS, vont libérer une molécule qui n'est pas une cytokine, mais qui possède les mêmes propriétés. La HMBG1 (*High Mobility Box Group-1*) est une protéine nucléaire qui lie l'ADN et contrôle l'expression de certaines

cytokines pro-inflammatoires. On la retrouve également dans le cytoplasme. Cette protéine joue un rôle important dans la régulation de l'inflammation. La HMBG1 possède une activité pro-fibrosante. Elle se fixe sur le même récepteur que le TGF- β , le récepteur RAGE (*Receptor for Advanced Glycation End-products*) (He *et al.*, 2007). Trois études récentes ont montré l'implication de cette protéine dans différentes pathologies pulmonaires inflammatoires comme la fibrose pulmonaire, les infections bactériennes et la mucoviscidose, ce qui fait de cette protéine une cible thérapeutique potentielle (Hamada *et al.*, 2008 ; Rittirsch *et al.*, 2008 et Rowe *et al.*, 2008).

b. Les chimiokines

Les principales sont l'IL-8 (CXCL-8), le GRO- α (*Growth Related Oncogen-alpha*), les MIP-1 α/β (*Macrophage Inflammatory Protein* ou CCL2 et 3) et les MCP-1 (*Monocyte Chemotactic Protein* ou CCL-2). Ces chimokines ont de fortes propriétés chimioattractantes pour les neutrophiles (IL-8, en particulier) et pour les macrophages.

c. Les facteurs de croissance

Les macrophages alvéolaires vont produire différents facteurs de croissance. Le GM-CSF, important pour l'activation et la survie des neutrophiles, le TGF- α (*Transforming Growth Factor-alpha*), impliqué dans l'induction de la sécrétion de mucines par les cellules épithéliales et le TGF- β impliqué dans le processus de fibrose (Barnes, 2004a, b).

d. Les dérivés lipidiques

Les macrophages alvéolaires expriment différentes enzymes impliquées dans le métabolisme des lipides. La cyclooxygénase (COX-2) va être à l'origine de la synthèse des prostaglandines comme la E2 (PGE2). La production de COX-2 (*Prostaglandin H Synthase 2*) peut être régulée par le NF- κ B et est fortement activée lors d'un stress oxydatif (Taha *et al.*, 2000). La concentration de la PGE2 est fortement augmentée chez les patients atteints de BPCO (Montuschi *et al.*, 2003). La phospholipase A2 cytosolique va être à l'origine de deux dérivés lipidiques que sont le leucotriène B4 (LTB4) et le PAF (*Platelet-Activating Factor*). Ces deux molécules sont des puissants chimioattractants et activateurs des neutrophiles et des macrophages. La concentration plasmatique du LTB4 est augmentée chez les patients atteints de BPCO. Des antagonistes des récepteurs du LTB4 diminuent le recrutement des neutrophiles (Silbaugh *et al.*, 2000).

V. Rôle de la coopération des cellules de l'immunité, des cellules épithéliales et endothéliales dans les BPCO

L'exposition des macrophages humains à des extraits de fumée de cigarette induit une forte modulation de l'expression de tous ces médiateurs de l'inflammation *in vitro* (Kent *et al.*, 2008). Les macrophages vont être les principaux activateurs des neutrophiles *in vivo*. Cette synergie bénéfique lors d'une infection peut devenir néfaste lorsqu'elle n'est pas contrôlée et être à l'origine de pathologies inflammatoires pulmonaires comme les BPCO.

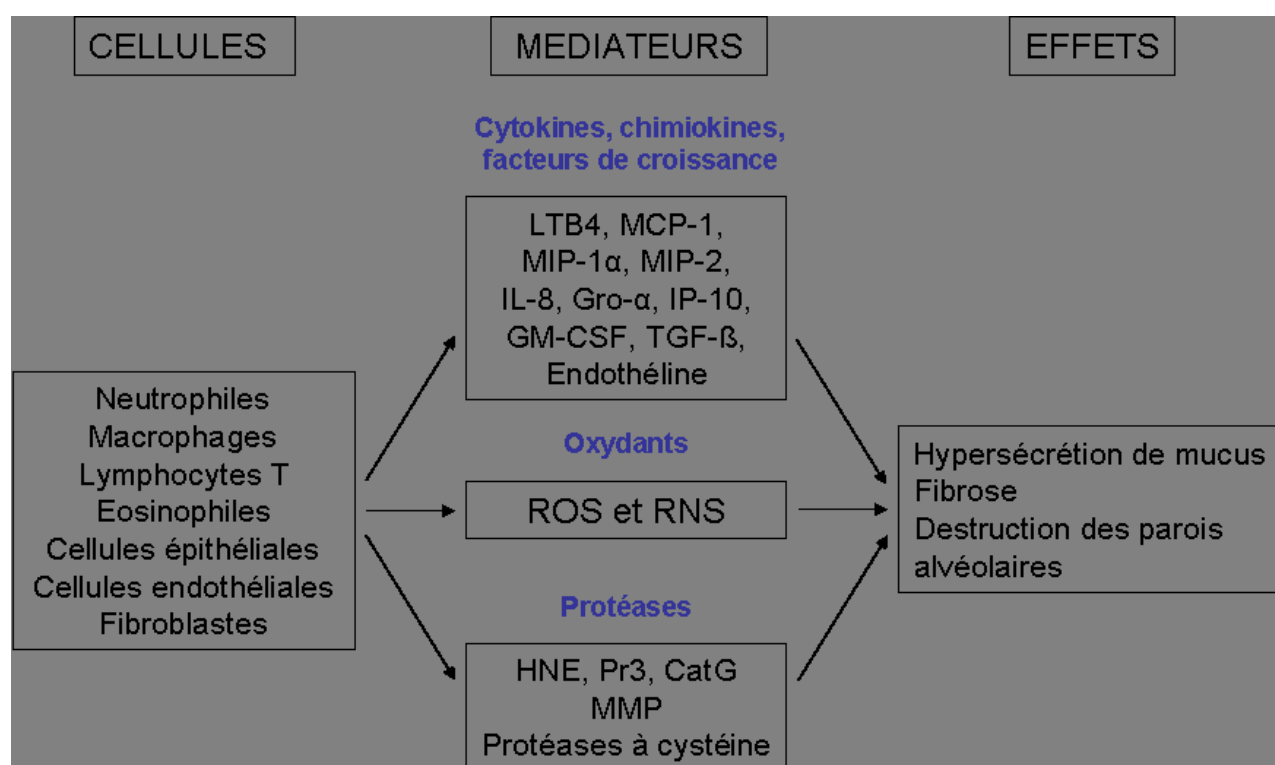


Figure 9 : Schéma représentatif des différentes cellules, des médiateurs de l'inflammation et leurs effets dans les pathologies inflammatoires pulmonaires. (D'après Barnes, 2004).

Il a été récemment montré chez la souris que l'auto-immunité vis-à-vis de fragments d'élastine pouvait être à l'origine de l'apparition d'emphysème. Les macrophages et les neutrophiles de souris exposées à la fumée de cigarette vont sécréter des protéases dans les poumons : l'élastase de neutrophile, les MMP-9 et MMP-12 pour les macrophages, conduisant à la libération de fragments d'élastine. Cette activité élastinolytique n'est pas à l'origine de l'emphysème. Mais l'exposition continue à la fumée de cigarette va augmenter la quantité de fragments d'élastine qui vont pouvoir être présentés par les cellules dendritiques aux LT, qui vont ensuite activer la multiplication de LB « anti-élastine ». La diminution du

nombre de LTreg au niveau pulmonaire va permettre l'expansion clonale de LT anti-élastine de type Th1 et la production de cytokines et chimiokines telles l'IFN- γ , l'IP-10 (*Interferon-gamma-induced protein of 10kDa* ou CXCL10) et le MIG (*Monokine-Induced by interferon gamma* ou CXCL9). L'activation du récepteur CXCR3, situé la surface des neutrophiles et des macrophages par les chimiokines CXCL9 et CXCL10, va induire la libération massive d'élastase de neutrophile et de MMP-12 dans le milieu. La MMP-12 va inactiver l' α 1-PI, inhibiteur principal de l'élastase de neutrophile *in vivo*, aboutissant ainsi à une dégradation non contrôlée de l'élastine et donc à l'apparition d'un emphysème (Lee *et al.*, 2007). Il est à noter que les cathepsines B, L et S, libérées par les macrophages, sont capables d'inactiver le SLPI (*Secretory Leukocyte Protease Inhibitor*), un autre inhibiteur puissant d'HNE (Taggart *et al.*, 2001).

La synergie entre les cellules de l'immunité, les cellules épithéliales et endothéliales explique la complexité des différentes pathologies inflammatoires (Figure 9). La libération de médiateurs de l'inflammation joue un rôle central dans ces interconnections cellulaires conduisant au recrutement des cellules phagocytaires comme les neutrophiles, cellules auxquelles nous allons nous intéresser dans ce second chapitre.

Chapitre II : Les neutrophiles, cellules de l'immunité

I. Généralités sur le neutrophile

Les neutrophiles, également appelés polynucléaires neutrophiles sont les leucocytes sanguins les plus abondants, ils représentent 50 à 75% des leucocytes totaux. Ces cellules sont très rapidement mobilisables et sont les premières à se rendre sur le site de l'inflammation. Ils ont un diamètre de 10 à 14 μm , ils sont caractérisés par un noyau multilobé (2 à 5 lobes) et possèdent différents granules cytoplasmiques (Figure 10).

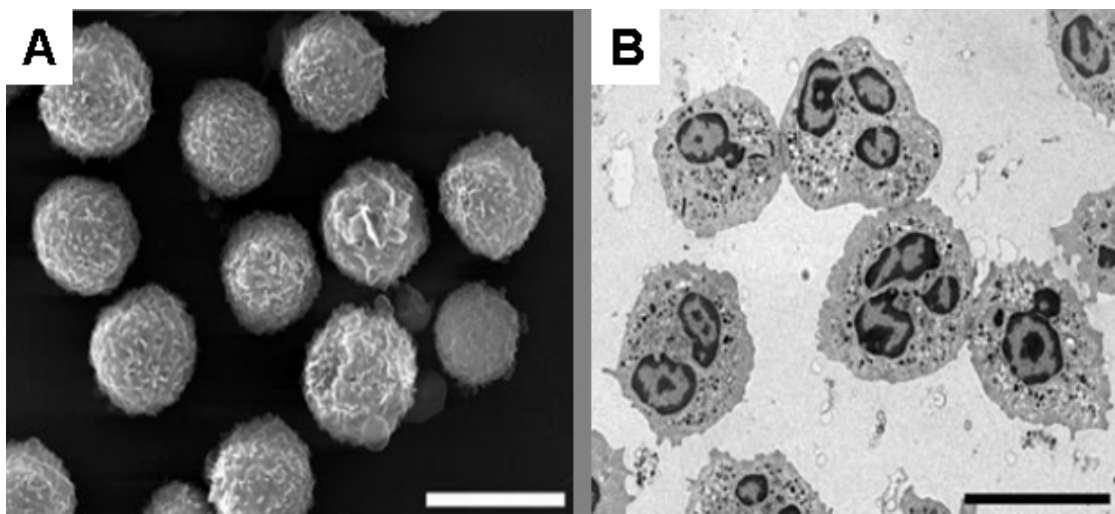


Figure 10 : Structure du polynucléaire neutrophile quiescent en suspension, observé en microscopie électronique à balayage (A) et en microscopie électronique à transmission (B). Les barres d'échelle représentent 10 μm (D'après Brinkmann *et al.*, 2004).

Leur maturation se fait dans la moelle osseuse à partir de cellules souches pluripotentes (Figure 11).

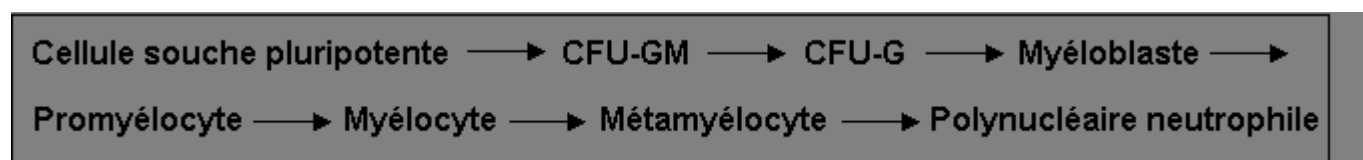


Figure 11 : Représentation des différents stades de différenciation des neutrophiles. CFU-GM : Colony Forming Unit-Granulocyte Monocyte et CFU-G : Colony Forming Unit-Granulocyte.

Au cours du processus de différenciation, la taille des cellules ne cesse de diminuer. A partir de l'étape métamyélocyte, les cellules ne subissent plus de divisions, mais continuent de

se transformer en neutrophiles adultes. Ce processus dure environ deux semaines. Les cellules matures sont séquestrées deux jours supplémentaires avant d'être libérées dans la circulation sanguine où elles ont un temps de demi-vie très court de huit heures. Environ 10^{11} neutrophiles sont synthétisés chaque jour.

Les neutrophiles sont répartis en deux secteurs dans le sang : le secteur circulant et le secteur marginé. Les neutrophiles du secteur marginé correspondent aux cellules qui sont plaquées le long des vaisseaux sanguins. Ces neutrophiles sont fonctionnels et immédiatement mobilisables. On les retrouve essentiellement au niveau de la rate, du foie et des poumons. Seul le secteur circulant peut être mesuré lors d'une numération. Le secteur marginé comprend le même nombre de neutrophiles que le secteur circulant.

Les neutrophiles sont des acteurs majeurs dans la réponse immunitaire innée, ils sont capables de phagocyter les microorganismes et de ralentir leur croissance. Ils vont contrôler l'infection avant l'organisation de la réponse immunitaire adaptative spécifique puis vont être, à leurs tours, éliminés par phagocytose par les macrophages. Ils ne repassent donc pas dans la circulation sanguine après avoir été recrutés au site de l'infection.

II. Les granules du neutrophile

Les granules des neutrophiles sont formés séquentiellement pendant la différenciation cellulaire myéloïde (Borregaard et Cowland, 1997) (Figure 12). La formation des granules ou granulopoïèse est initiée très rapidement dès le stade promyélocyte. Les granules primaires sont les premiers granules à être formés. Ils ont d'abord été nommés « granules positifs à la peroxydase » compte tenu de leur forte concentration en myéloperoxydase (MPO). Depuis 1969, on les appelle également granules azurophiles en raison de leur affinité pour le colorant basique, l'azure A (Spicer et Hardin, 1969). Deux autres types de granules sont formés : les granules secondaires ou spécifiques et les granules tertiaires ou granule de gélatinase. Les granules secondaires sont formés pendant les stades myélocytes et métamyélocytes. Ils possèdent une grande quantité de lactoferrine et une faible concentration en gélatinase. Les granules tertiaires, qui se forment durant la fin de la maturation, sont riches en gélatinase et très peu concentrés en lactoferrine. Les derniers granules, appelés granules de sécrétion n'apparaissent que chez les neutrophiles matures.

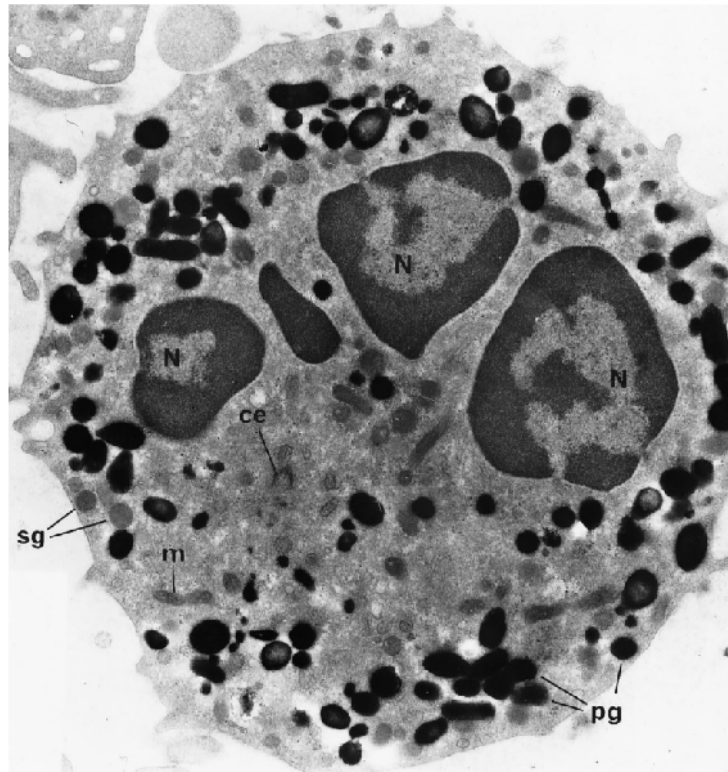


Figure 12 : Observation en microscopie électronique à transmission des granules intracytoplasmiques du neutrophile quiescent. pg : *primary granules* ou granules primaires (azuropiles), sg : *specific granules* ou granules spécifiques (secondaires), N : noyau, ce : centriole, m : mitochondrie (D'après Witko-Sarsat *et al.*, 2000).

Les quatre types de granules des neutrophiles n'ont pas la même composition en protéines et vont donc jouer un rôle précis dans l'activité anti-microbienne, la migration et la réponse inflammatoire de ces cellules (Tableau II).

A. Les granules azuropiles

Les granules azuropiles vont être principalement impliqués dans l'activité anti-microbienne, la dégradation, la digestion et le chimiotactisme. En effet, ces granules sont riches en molécules anti-microbiennes comme la MPO, les défensines, la BPI (*bactericidal/permeability-increased protein*) ainsi que les serprocidines.

	Granules primaires (azurophiles)	Granules secondaires (spécifiques)	Granules tertiaires (Gélatinases)	Vésicules sécrétrices
MEMBRANE	CD63 CD68 Preseniline 1 Stomatine ATPase H ⁺ de type V	CD11b/CD18 CD15 CD66 CD67 Cytochrome b ₅₅₈ Récepteur du fMLP Récepteur de la fibronectine Récepteur de la laminine Sous-unité de la protéine Gα Leucolysine Antigène NB1 Protéine de 19 kDa Protéine de 155 kDa Rap1, Rap2 SCAMP SNAP-23, -25 Stomatine Récepteur de la thrombospondine Récepteur du TNF ^a Récepteur de l'uPA (uPAR) VAMP-2 Récepteur de la vitronectine Gp91phox/p22phox	CD11b/CD18 Récepteur du fMLP Enzyme de déacétylation du diacylglycérol Cytochrome b ₅₅₈ Leucolysine SCAMP NRAMP-1 Récepteur de l'uPA VAMP-2 ATPase H ⁺ de type V Gp91phox/p22phox MMP25 SNAP-23 Récepteur du TNF ^a CD67	CD11b/CD18 MMP25 Nrap-1 Gp91phox/p22phox VAMP-2, SNAP-23 Phosphatase alcaline CD13, CD14, CD16, CD45 CR1, CD10, CD16 CD35, CD67 Récepteur de C1q Cytochrome b ₅₅₈ DAF, MyD88 ^a Récepteur du fMLP Leucolysine ATPase H ⁺ de type V IFNα-R1 et IFNα-R2 ^a IFNγ-R1 et IFNγ-R2 ^a Récepteur 1 et 2 du TNF ^a Récepteur de IL-1,4,6,10 ^a Récepteur de IL-13,17,18 ^a CXCR1, CXCR2, CXCR4 ^a CCR1, 2, 3 ^a Récepteur Fc Ig(G,A,E) ^a TREM-1, MD-2 ^a LIR1-4,-6,-7,-9 ^a Récepteur 2 du TGF-β ^a
MATRICE	Elastase Cathepsine G Protéase 3 Lysozyme, défensines BPI, MPO, azurocidine Ubiquitine Sialidase α-mannosidase β-glucuronidase β-glycérophosphatase Mucopolysaccharide acide α1-PI N-acétyl-β- glucosaminidase	α2-microglobuline Collagénase CRISP-3 (SGP-28) Gélatinase hCAP-18 Histaminase Héparanase Lactoferrine Lysozyme NGAL uPA Sialidase Transcobalamine-I Protéase 3* α1-PI ^a , SLPI cystatine c et cystatine f ^a Haptoglobine, pentraxine 3	Acétyltransférase α2-microglobuline CRISP-3 (SGP-28) Gélatinase Lysozyme Arginase 1	Protéines plasmatiques Protéase 3*

Tableau II : Contenu des différents granules du neutrophile. (D'après Faurschou et Borregaard, 2003 ; Borregaard *et al.*, 2007 et *Witko-Sarsat *et al.*, 1999). ^a : Localisation attribuée à partir de l'étude du profil d'expression des gènes au cours du développement des neutrophiles.

La MPO est une hémoprotéine de 150 kDa qui peut être soit libérée dans le phagolysosome après la phagocytose ou libérée dans l'espace extracellulaire après dégranulation des neutrophiles. La MPO transforme, en présence d'ions chlorures, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), produit par la NADPH oxydase, en acide hypochloreux (HClO). La MPO peut également oxyder des nitrites pour donner des RNS. Ces dérivés de l'oxygène et de l'azote sont des agents antimicrobiens puissants (Klebanoff, 2005).

Les défensines sont des peptides cationiques d'environ 3,5 kDa (12 à 50 acides aminés). Elles représentent environ 5% des protéines totales des neutrophiles. On retrouve deux types de défensines : les α -défensines et les β -défensines, qui diffèrent par leurs structures soit en hélice α ou en feuillet β . Elles sont actives contre les bactéries comme *P. aeruginosa*, *S. aureus* et les champignons comme *Candida albicans* (*C. albicans*) (Ganz, 2003 ; Schneider *et al.*, 2005).

La BPI (*bactericidal/permeability-increased protein*) est une protéine de 55 kDa, cationique, constituée de deux domaines qui possèdent des activités biologiques différentes. Le domaine N-terminal contient l'activité anti-bactérienne, la propriété de neutraliser les toxines bactériennes comme le LPS et des propriétés anti-angiogéniques. Le domaine C-terminal, quant à lui, possède la propriété d'être reconnu par des récepteurs sur les neutrophiles et les macrophages. Lorsque la BPI est fixée aux bactéries, en particulier aux bactéries à Gram négatif, elle va servir d'opsonine et va pouvoir augmenter la phagocytose des pathogènes par ces cellules (Schultz et Weiss, 2007).

Les granules azurophiles contiennent quatre protéines cationiques, très proches d'un point de vue structural, appelées serprocidines. Les serprocidines présentent une forte activité anti-bactérienne et anti-fongique. Les serprocidines sont des protéases à sérine qui peuvent être divisées en deux groupes : les NSPs : l'élastase leucocytaire (HNE), la cathepsine G (CatG) et la protéase 3 (Pr3) qui possèdent une activité protéolytique et l'azurocidine qui est inactive. L'azurocidine est une protéine de 37 kDa, également appelée hCAP37 (*human Cationique Antimicrobial Protein 37 kDa*) ou HBP (*Heparin-Binding Protein*). C'est une protéase à sérine qui a perdu son activité enzymatique car deux des trois résidus de la triade catalytique, impliqués dans l'activité enzymatique des protéases à sérine, ont été mutés. L'azurocidine possède une forte activité anti-bactérienne vis-à-vis des bactéries à Gram négatif et une forte activité chimioattractante pour les monocytes. Elle peut également lier les

toxines bactériennes et augmenter la perméabilité vasculaire lors de son contact avec des cellules endothéliales (Watorek, 2003). Les trois NSPs sont des protéines de 28 à 30 kDa. Elles présentent une forte activité enzymatique dirigée contre différents constituants de la matrice extracellulaire comme l'élastine, le collagène de type IV, les laminines, la vitronectine et la fibronectine. Leurs activités anti-bactériennes et antifongiques peuvent être indépendantes de leurs activités protéolytiques. Elles sont fortement impliquées dans le processus inflammatoire (Korkmaz *et al.*, 2008 ; .Pham, 2008). Ces protéases feront l'objet d'une étude plus détaillée par la suite.

B. Les granules secondaires

Comme les granules azurophiles, les granules secondaires ou spécifiques vont être impliqués dans l'activité anti-microbienne, la dégradation, la migration et dans les processus d'activation cellulaires. En effet, ces granules sont riches en protéines anti-microbiennes comme la lactoferrine, la protéine hCAP18, la protéine NGAL, le lysozyme, la collagénase (MMP-8) et des récepteurs aux protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la laminine et la thrombospondine.

La lactoferrine est une glycoprotéine de 78 kDa. Elle est active contre un large spectre de microorganismes. Elle fait partie de la famille des transferrines. Ce sont des protéines qui peuvent lier le fer et donc appauvrir le milieu en cet élément, qui est nécessaire à la survie des bactéries, lors d'une infection. La lactoferrine possède donc une activité bactériostatique et fongistatique, elle ralentit la croissance bactérienne et fongique, mais possède également une activité bactéricide (Legrand *et al.*, 2008 ; Zarembek *et al.*, 2007). Sa partie N-terminale en hélice α amphipatique peut s'insérer au niveau des membranes bactériennes et provoquer des dommages membranaires irréversibles aboutissant à la lyse des pathogènes (Chapple *et al.*, 1998). De plus, des travaux ont montré que la lactoferrine possède une activité protéase à sérine capable de dégrader deux facteurs de virulence de surface de *H. influenzae* : la protéase IgA1 et l'adhésine Hap (Qiu *et al.*, 1998 ; Hendrixson *et al.*, 2003). La lactoferrine semble pouvoir prévenir la formation de biofilms par *P. aeruginosa*, à des concentrations inférieures à celles utilisées pour obtenir les activités bactéricides, bactériostatiques et fongistatiques (Singh, 2002).

La protéine hCAP18 (*human Cationic Antimicrobial Peptide 18 kDa*) est la proforme de la seule cathélicidine humaine, la LL-37 (37 acides aminés). Les cathélicidines sont des peptides antimicrobiens puissants (Zanetti, 2005). La protéine hCAP18 est peu active. Ce n'est qu'après la maturation par clivage protéolytique qu'elle va présenter de multiples fonctions. L'enzyme responsable de la maturation extracellulaire est la Pr3, stockée dans les granules azurophiles (Sorensen *et al.*, 2001). La Pr3 va libérer deux fragments, le fragment C-terminal appelé LL-37 et le domaine N-terminal appelé *cathelin-like domain* de 14 kDa. La LL-37 possède une forte activité anti-bactérienne et anti-fongique. La LL-37 peut s'insérer dans les membranes lipidiques et causer des dommages irréversibles conduisant à la lyse des pathogènes (Chen *et al.*, 2005 ; den Hertog *et al.*, 2005). La LL-37 possède également des propriétés pro-angiogéniques, chimioattractantes pour les neutrophiles, les lymphocytes et les monocytes, sécrétagogue (IL-8), elle accélère la cicatrisation, augmente la prolifération des cellules épithéliales pulmonaires (Kai-Larsen, 2008), induit la nécrose chez les neutrophiles (Zhang *et al.*, 2008) et diminue la formation de biofilms de *P. aeruginosa* (Overhage *et al.*, 2008). Le domaine N-terminal présente une similarité de séquence avec les cystatines, inhibiteurs de protéases à cystéine. Des travaux ont montré que ce domaine est inhibiteur de la cathepsine L et qu'il possède également des propriétés bactériostatiques vis-à-vis de *S. aureus* résistant à la méthycilline et bactéricides vis-à-vis de *Escherichia coli* (*E. coli*) (Zaiou *et al.*, 2003). Une étude récente a montré que la LL-37 et l'azurocidine (granule azurophile) sont nécessaires pour le recrutement spécifique de monocytes avec un phénotype « inflammatoire », différent des macrophages résidents, dans un modèle murin d'inflammation (Soehnlein *et al.*, 2008).

La protéine NGAL (*Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin*), également appelée lcn2 ou sidérochaline, est une protéine de 25 kDa qui peut se présenter sous différentes formes : monomère, homodimère ou hétérodimère. En effet, elle peut être liée à la gélatinase du neutrophile (MMP-9) (Kjeldsen *et al.*, 1993). Il existe un homologue murin de cette protéine appelé 24p3. Les souris KO pour cette protéine sont beaucoup plus sensibles aux infections par *E. coli* (Borregaard et Cowland, 2006). Les protéines NGAL/24p3 sont capables de lier les sidérophores de type cathécolate, piègeurs de fer bactériens, et donc de priver les bactéries en cet élément essentiel, ce qui inhibe leur croissance (Goetz *et al.*, 2002).

Le lysozyme est une protéine cationique de 14 kDa (129 acides aminés). Cette protéine possède des activités anti-bactériennes, en particulier contre les bactéries à Gram

positif, mais aussi vis-à-vis de *C. albicans*. On retrouve cette protéine dans les larmes, la salive mais aussi dans le blanc d'œuf. Elle est présente dans tous les granules des neutrophiles mais en quantité plus importante dans les granules spécifiques. Le lysozyme est une hydrolase (EC.3.2.1.17) qui a pour substrat le peptidoglycane, composant majoritaire de la membrane des bactéries à Gram positif. Le lysozyme va cliver les liaisons covalentes entre l'acide N-acétyl-muramique et l'acide N-acétyl-glucosamine. Il a été montré que l'activité antimicrobienne du lysozyme n'était pas essentiellement due à son activité enzymatique. En effet, des études ont montré que le lysozyme dénaturé par chauffage ou par traitement avec du DTT ne diminuait pas son pouvoir antibactérien, qui serait dû à la présence d'une structure hélice-boucle-hélice dans la protéine en plus de son caractère cationique et hydrophobe (Pellegrini *et al.*, 1992 ; Ibrahim *et al.*, 2001).

La MMP-8, également appelée collagénase du neutrophile, est une enzyme de 75 kDa stockée sous forme de proforme (pro-MMP-8). Elle est activée par clivage protéolytique par d'autres MMPs comme la stromélysine 2, la MT-MMP1 et la MMP-7 (Knäuper *et al.*, 1996 ; Holopainen *et al.*, 2003 ; Dozier *et al.*, 2006). Cette enzyme a pour principales cibles les collagènes de type I et II, qui ne sont pas clivés par les NSPs. Cette enzyme joue un rôle important dans la migration des neutrophiles au site de l'inflammation ; son activité est corrélée à la sévérité de plusieurs pathologies inflammatoires chroniques ou non (Van Lint et Libert, 2006). La MMP-8 est capable d'inactiver l' α 1-PI libéré par les neutrophiles (Michaelis *et al.*, 1990). Une étude récente a montré que les activités protéolytiques combinées de la MMP-8, de la MMP-9 et de la prolyl endopeptidase (protéase à sérine) sont impliquées dans la libération de peptides chimioattractants pour les neutrophiles, les Ac-PGP, issus de l'hydrolyse du collagène (Gaggar *et al.*, 2008).

C. Les granules tertiaires

Ces granules contiennent des protéines essentiellement impliquées dans la migration des neutrophiles. En effet, ces granules sont riches en récepteurs membranaires, en MMP-9 et d'autres protéines comme la protéine Nramp1.

Dans ces granules, on retrouve en particulier, le récepteur au fMLP (*N*-formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine ou *fMLF*) et le récepteur à l'uPA ou uPAR (*urokinase-type Plasminogen Activator Receptor* ou CD87). Le fMLP est un puissant chimioattractant

d'origine bactérienne qui fait partie de la famille des peptides (di-, tri- ou térapeptides) formylés libérés soit *in vivo* ou après lyse cellulaire. Le récepteur au fMLP fait partie des FPR (*Formyl Peptide Receptor*) qui sont des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. Ce récepteur va être essentiel pour le chimiotactisme, l'organisation de la migration des neutrophiles et des monocytes au site de l'inflammation ainsi que la réponse inflammatoire (Panaro *et al.*, 2006). L'uPAR et son ligand, le pro-uPA, sont synthétisés par les neutrophiles. On les retrouve à la fois dans les granules secondaires et tertiaires. Le pro-uPA ou activateur du plasminogène de type urokinase voit son activation accélérée, après fixation par son domaine N-terminal de type facteur de croissance à l'uPAR, par clivage protéolytique sous l'action de la kallicréine plasmatique mais aussi par le facteur XIIa, la cathepsine B, la plasmine ou l'uPA (Vassalli *et al.*, 1991 ; Hoyer-Hansen *et al.*, 1992 ; Beaufort *et al.*, 2006). L'uPA va transformer le plasminogène en plasmine, enzyme importante pour la dégradation de la fibrine, une protéine impliquée dans la coagulation. Elle intervient également dans l'activation de nombreuses MMPs, dans les phénomènes de migration cellulaire, de remodelages tissulaires et donc dans la réaction inflammatoire et l'immunité. L'uPAR est une glycoprotéine constituée de trois domaines nommés D1, D2 et D3. Ce récepteur est lié à des glycolipides membranaires via une liaison de type GPI (*Glycosyl Phosphatidyl Inositol*). L'activité de l'uPA peut être régulée soit directement par des inhibiteurs que sont les PAI-1 et PAI-2 (*Plasminogen Activator Inhibitor-1 et -2*), soit par la protéolyse de l'uPAR. En effet, l'uPAR est dégradé par l'HNE, la CatG, la plasmine, la kallicréine 4 (hK4), l'HAT (*Human Airway Trypsin-like*) et la métalloprotéase LasB de *P. aeruginosa* (Rockway et Giranda, 2003 ; Beaufort *et al.*, 2004a, b ; Beaufort *et al.*, 2006 ; Leduc *et al.*, 2007). Il est à noter que l'uPAR peut également lier un autre ligand, la vitronectine.

La MMP-9 (92 kDa), également appelée gélatinase B, est stockée sous forme de pro-forme dans les granules tertiaires. On la retrouve également dans les granules secondaires mais en plus faible quantité. Il a été récemment montré que cette MMP jouait un rôle important dans les pathologies pulmonaires et qu'elle pouvait être une cible thérapeutique intéressante (Muroski *et al.*, 2008). En effet, une surexpression de cette enzyme chez des souris aboutit à l'apparition d'emphysème associé à une perte d'élastine alvéolaire (Forojny *et al.*, 2008). Cette enzyme est fortement concentrée dans les LLBA de patients asthmatiques (Ohbayashi et Shimokata, 2005). L'activation de la pro-MMP-9 peut se faire soit par clivage protéolytique par la MMP-2, par la MMP-3 (stromélysine-1) après activation par la plasmine

et par l'uPA (Baramova *et al.*, 1997 ; Ramos-DeSimone *et al.*, 1999 et Zhao *et al.*, 2008) ou soit par clivage oxydatif (DiScipio *et al.*, 2006). L'HNE peut activer la MMP-9 mais pas la CatG (Visser et Winterbourn, 1988). Comme la collagénase, la gélatinase inactive l' α 1-PI (Visser *et al.*, 1988). La MMP-9 est capable de dégrader les constituants de la matrice extracellulaire comme les collagènes, en particulier ceux de type V, la fibronectine, l'élastine, les laminines et les protéoglycanes. Cette enzyme joue un rôle important dans le processus de migration des neutrophiles au travers de la membrane basale. Des travaux récents ont montré que des souris KO pour la MMP-9 sont moins résistantes que les souris sauvages à une inflammation induite par l'ozone. Ce rôle protecteur n'est pas encore bien défini mais il serait dû à des modifications d'expression des cytokines pro-inflammatoires KC et MIP-2 (*Keratinocyte-derived Chemokine* et *Macrophage Inflammatory Protein-2*) (Yoon *et al.*, 2007).

La leucolysine, également appelée MMP-25 ou MT6-MMP (*Membrane-Type 6 MMP*), est la dernière MMP décrite. Cette MMP est associée aux membranes des cellules épithéliales de la rate et des poumons par une liaison de type GPI (Velasco *et al.*, 2000). On la retrouve également dans les neutrophiles, où elle a été décrite pour la première fois, des granules secondaires aux vésicules sécrétoires, avec une majorité dans les granules tertiaires (Kang *et al.*, 2001). Comme pour la MMP-9, elle est stockée sous forme de pro-forme. Elle est capable d'activer la pro-MMP-2 et d'inactiver l' α 1-PI, inhibiteur majoritaire de l'HNE *in vivo* (Nie et Pei, 2003 ; Nie et Pei, 2004). Elle clive les mêmes substrats que la MMP-9 avec une préférence pour les collagènes de type IV et est capable d'activer la pro-gélatinase A (pro-MMP-2) (English *et al.*, 2001).

La protéine Nramp1 (*Natural Resistant-Associated Macrophage Protein 1*) est un transporteur membranaire de 100 kDa décrit pour la première fois dans les macrophages murins (Vidal *et al.*, 2003). Il a été montré que Nramp1 était associé aux granules tertiaires du neutrophile et qu'après phagocytose de *C. albicans*, cette protéine se retrouvait associée à la membrane du phagolysosome (Canonne-Hergaux *et al.*, 2002). Nramp1 est un transporteur de cations divalents comme Zn^{2+} , Fe^{2+} et Mn^{2+} qui va permettre de priver les pathogènes phagocytés de ces éléments essentiels. Ce pouvoir bactériostatique est nécessaire pour l'élimination des pathogènes dans le phagolysosome (Cellier *et al.*, 2007).

D. Les vésicules de sécrétion

Les vésicules de sécrétion contiennent des molécules essentielles pour le déplacement, l'adhérence et le chimiotactisme des neutrophiles. Ces vésicules sont nécessaires dans la phase précoce d'inflammation. Après activation des neutrophiles par différentes molécules chimioattractantes comme le fMLP ou encore le C5a, les membranes des vésicules de sécrétion vont fusionner avec les membranes des neutrophiles après exocytose (Sengelov *et al.*, 1994). Les membranes des neutrophiles vont être alors enrichies en intégrine- $\beta 2$ CD11b/CD18 (appelé également Mac1 ou CR3), en récepteur du complément CR1, en FPR (récepteur de fMLP), en CD14 (récepteur du LPS), en CD16 (récepteur aux fragments Fc des IgG) et en leucolysine. L'apparition de ces nombreux récepteurs à la surface des neutrophiles est associée à celle de la L-sélectine, une intégrine impliquée dans l'adhésion des neutrophiles à l'endothélium activé (Borregaard *et al.*, 1994). L'apparition de récepteurs et des différentes intégrines sur les neutrophiles et les cellules endothéliales vont permettre aux neutrophiles d'adhérer à l'endothélium et de déclencher le processus de migration pour rejoindre le site de l'infection.

III. Les neutrophiles et la réaction inflammatoire

A. L'initiation

Les pathogènes, les allergènes ou les polluants continuellement inhalés vont être éliminés, en temps normal, sans déclencher de réaction inflammatoire soutenue. L'étape d'élimination va être réalisée soit par les macrophages résidents, par phagocytose ou par voie mécanique avec la clairance mucociliaire. Lorsque cette première barrière de défense est dépassée, lorsque les pathogènes sont trop nombreux ou très virulents, les neutrophiles vont être recrutés massivement au site de l'inflammation (Wagner et Roth, 2000). Pour cela, un gradient de signaux chimiotactiques va être créé avec la libération de molécules comme le fragment C5a du complément, des peptides d'origine bactérienne (fMLP) ainsi que des chimiokines et des leucotriènes. L'endothélium va, dans un même temps, surexprimer des molécules d'adhésion cellulaire (intégrines) qui vont permettre d'arrêter les neutrophiles circulants. Ensuite, les neutrophiles vont devoir passer au travers des vaisseaux sanguins par diapédèse, se déplacer dans les tissus pour pouvoir accéder au site de l'inflammation puis phagocyter les microorganismes et libérer leurs facteurs antimicrobiens. Les différentes

grandes étapes de recrutement des neutrophiles, c'est-à-dire le roulement, l'activation, l'adhérence forte à l'endothélium et la migration transcellulaire, ont été récemment précisées. En effet, des étapes supplémentaires ont été définies comme les étapes de roulement lent, l'arrêt et la migration intracellulaire (Figure 13) (Ley *et al.*, 2007 ; Zarbrock et Ley, 2008).

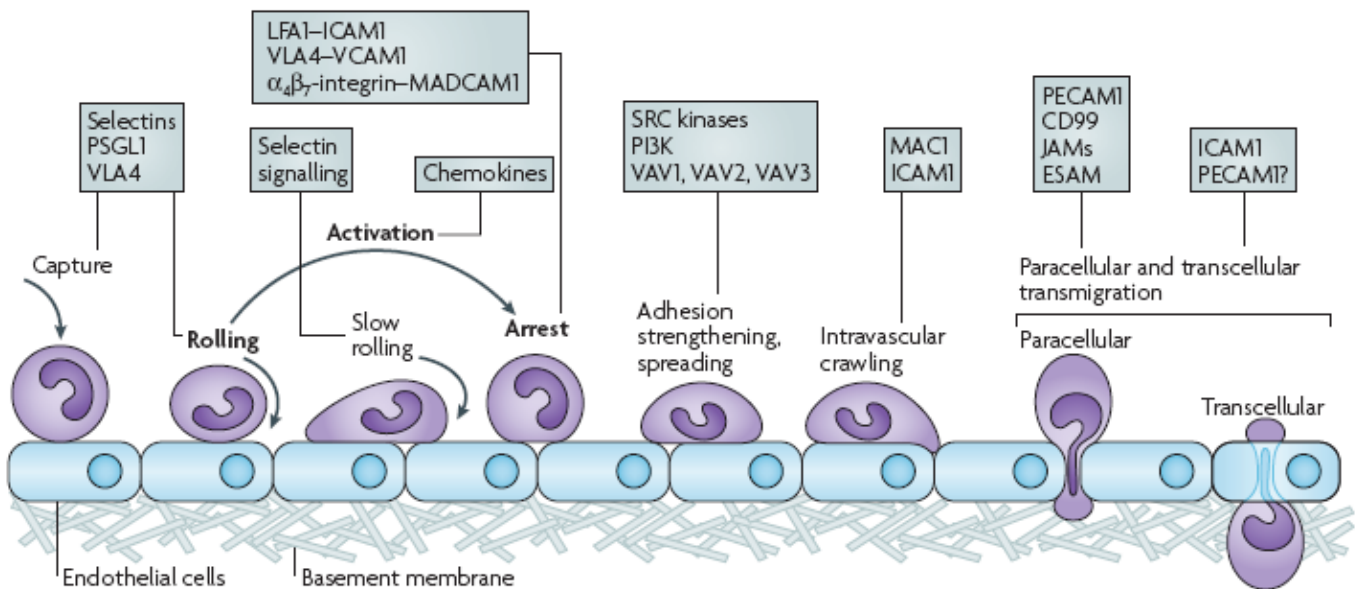


Figure 13 : Les différentes étapes de la migration transendothéliale des neutrophiles. Les principales molécules et leurs interactions, impliquées dans chaque étape de la migration transendothéliale, sont indiquées (D'après Ley *et al.*, 2007).

B. La capture, le roulement et le roulement lent

L'étape de roulement est la première étape de recrutement des neutrophiles au site de l'inflammation. Cette étape de roulement est précédée par une étape de capture des neutrophiles sur l'endothélium. Les étapes de capture et de roulement ne sont pas clairement définies à ce jour, car elles font intervenir les mêmes molécules d'adhésion. Ces deux étapes sont médiées par de nombreuses molécules de signalisation comme la L-sélectine, les intégrines et les oligosaccharides de surface qui vont permettre l'interaction entre les cellules endothéliales et les neutrophiles. La L-sélectine (CD62L) est présente à la surface des neutrophiles. Parmi les intégrines, les principales impliquées sont la P-sélectine (CD62P ou *granule membrane protein-140*) ainsi que la E-sélectine (CD62E ou ELAM-1 pour *Endothelial Cell-Leukocyte Adhesion Molecule-1*), présentes à la surface des cellules endothéliales. D'autres molécules comme la PECAM-1 (CD31 ou *Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule-1*), le PSGL1 (*P-selectin Glycoprotein Ligand-1*) sont impliquées dans ces interactions cellules-cellules. La PECAM-1 est exprimée par les deux types cellulaires et

est capable de former des homodimères. La PSGL1 est exprimée à la surface des neutrophiles et par quelques cellules endothéliales (DaCosta *et al.*, 2006). Cette molécule a été décrite comme interagissant avec la P-sélectine puis plus récemment avec les L-sélectines et les E-sélectines (McEver and Cummings, 1997).

La P-sélectine est très rapidement exprimée à la surface des cellules endothéliales en réponse aux médiateurs de l'inflammation. L'interaction des P- et L-sélectines avec leurs ligands respectifs initialise le phénomène de migration lors de l'inflammation (Ley, 1996 ; Alon *et al.*, 1997). Contrairement aux P- et L-sélectines, la E-sélectine est exprimée plus tardivement et est plus impliquée lors du roulement que lors de la capture. Elle apparaît quelques heures après stimulation des cellules endothéliales par l'Il-1 et le TNF- α , produits par les macrophages, ainsi que le LPS (Lawrence et Springer, 1993). La E-sélectine se lie aux oligosaccharides sialylés présents sur les neutrophiles comme le PSGL1 et ESL1 (*E-Selectin-Ligand-1*) (Hidalgo *et al.*, 2007). L'étape de roulement lent (*slow rolling*) correspond au ralentissement du roulement des neutrophiles. Cette étape est médiée par l'engagement d'un plus grand nombre d'intégrines.

Les trois étapes successives de capture, de roulement et de roulement lent sont déterminantes pour le recrutement des neutrophiles au site de l'inflammation. En effet, durant ces étapes, les neutrophiles vont capter et intégrer tous les signaux pro-inflammatoires provenant de l'endothélium. Plus les neutrophiles passent de temps attachés à l'endothélium, plus ils vont intégrer de signaux de migration et plus le seuil de signaux nécessaires à l'extravasation sera atteint. Dans le cas contraire, si les neutrophiles ne sont pas assez activés, alors ils se détachent et retournent dans la circulation.

C. L'activation et l'arrêt

Cette étape d'activation débute dès le début de la phase de roulement jusqu'à la phase dite d'arrêt. L'endothélium activé, lors d'une réaction inflammatoire, va produire des molécules à fort pouvoir chimioattractant telles que des leucotriènes comme le LTB₄, le PAF ainsi que des chimiokines. Ces dernières forment un groupe d'environ 40 cytokines impliquées dans de nombreuses réactions comme la migration cellulaire, le chimiotactisme et l'activation cellulaire (Rollins, 1997). Les chimiokines possèdent en général deux sites de fixation : un site de fixation pour son récepteur spécifique, fixation qui va entraîner l'activation des neutrophiles et un second site de fixation pour des glycosaminoglycanes (GAG) de surface comme des protéoglycanes ou des héparanes sulfates. La fixation des

chimiokines à ces GAG va permettre à ces dernières de rester disponibles plus longtemps dans l'environnement et d'activer les neutrophiles au site de l'inflammation. Ces chimiokines peuvent également être produites par les tissus environnants et par les plaquettes. Ces chimioattractants vont activer les neutrophiles et entraîner l'expression de nouvelles intégrines comme LFA1 (*Leukocyte Function-Associated Antigen-1* ou intégrine $\alpha_2\beta_1$), MAC-1 (*Macrophage Antigen-1*), les intégrines CD11a/CD18b et CD11b/CD18b. Ces intégrines vont former des îlots pour mieux interagir avec leurs récepteurs exprimés à la surface des cellules endothéliales, les CAM (*Cellular Adhesion Molecule*), qui appartiennent à la superfamille des Ig. LFA1 et MAC-1, par exemple, vont interagir avec les ICAM1. De même, les intégrines $\alpha_4\beta_7$ vont interagir avec le MADCAM1 (*Mucosal vascular Addressin Cell-Adhesion Molecule 1*). Ce type d'interaction intégrine-récepteur va favoriser l'arrêt des neutrophiles sur l'endothélium (Ley *et al.*, 2007).

D. L'adhérence forte à l'endothélium

Ces interactions intégrine-récepteur vont entraîner des modifications dans le recrutement de kinases en particulier des tyrosine kinases comme les Src (*SRC Kinases*) ainsi que des PI3K (*PhosphoInositide 3 kinase*). Il a été montré que ces kinases jouaient un rôle important dans la stabilisation des neutrophiles après la phase d'arrêt (Giagulli *et al.*, 2006 ; Smith *et al.*, 2006). Plus précisément, les VAV1 à 3 (*guanine nucleotide-exchange factor*) qui sont des domaines liant les nucléotides, sont nécessaires pour l'activité des SRC Kinases (Schymeinsky *et al.*, 2006).

E. L'infiltration (*crawling*) et la transmigration transendothéliale

Cette étape va permettre aux neutrophiles de s'infiltrer à travers l'endothélium sans trop le déstructurer. Cette migration est dépendante des signaux MAC-1 et ICAM1 et ne s'effectue que lorsque les neutrophiles ont trouvé des sites préférentiels de transmigration. Il va y avoir deux types de migration possibles : intercellulaire et intracellulaire. La voie intracellulaire sera choisie lorsque la voie intercellulaire ne sera pas possible (Ley *et al.*, 2007). Les interactions entre les intégrines et leurs récepteurs comme ICAM1 et VCAM1 (*Vascular Cell-Adhesion Molecule-1*) vont engendrer la formation de complexes comprenant ICAM1, VCAM1 et des molécules cytoplasmiques comme les protéines ERM (*Ezrin, Radixin and Moesin*) ainsi que des composants du cytosquelette comme la vinculine, la taline-1 et

l'actine. Ces complexes vont favoriser la migration des neutrophiles à travers l'endothélium (Carman et Springer, 2004).

1. La migration intercellulaire

La migration intercellulaire implique majoritairement deux molécules de la superfamille des Ig : PECAM1 et les JAM (*Junctional Adhesion Molecule*) en particulier JAM-A. Ces deux molécules se regroupent à la surface des cellules endothéliales afin de former un guide pour les neutrophiles. D'autres molécules de la même famille sont également impliquées comme JAM-B, JAM-C, ICAM1, ICAM2, ESAM (*Endothelial Cell-Selective Adhesion Molecule*) et une protéine n'appartenant pas à la superfamille des Ig : CD99. LFA1 interagit avec les ICAM1 et 2. PECAM1, CD99 et les JAM sont exprimés par les deux types cellulaires et interagissent entre eux. Les JAMs peuvent également interagir avec les intégrines. L'importance de ces molécules d'adhésion lors de la transmigration a été mise en évidence grâce à des modèles de souris KO pour les gènes codant ces protéines (Ley *et al.*, 2007). En plus de ces interactions entre les neutrophiles et l'endothélium, il y a une désorganisation des composants des jonctions serrées comme la VE-cadhérine et la β -caténine, une désorganisation qui peut être due à de la protéolyse impliquant les protéases contenues dans les granules des neutrophiles (Del Maschio *et al.*, 1996). Il a été montré que l'HNE et la CatG pouvaient être impliquées dans la dégradation de la VE-cadhérine (Hermant *et al.*, 2003).

2. La migration intracellulaire

La migration intracellulaire est beaucoup moins fréquente que la migration intercellulaire. On rencontre ce type de migration dans le système nerveux central et dans des modèles de migration cellulaire *in vitro*. Cette migration impliquerait la formation de VVO (*Vesiculo-Vacuolar Organelles*), qui correspond à des régions riches en cavéoline-1 et en actine-F liées aux membranes des cellules, formant des canaux par lesquels peuvent migrer les neutrophiles. Ces canaux sont supportés par des protéines du cytosquelette comme la vimentine et l'actine (Feng *et al.*, 1998 ; Dvorak et Feng, 2001 ; Ley *et al.*, 2007).

F. La migration dans la membrane basale

Les neutrophiles qui ont traversé l'endothélium se retrouvent au niveau de la membrane basale, soutien essentiel des cellules endothéliales. Cette membrane basale est

composée deux types de protéines de structure : les laminines, en particulier les laminines 8 et 10 et le collagène de type IV qui sont intimement connectés par des héparanes sulfates, des protéoglycanes et le nidogène-2. Les neutrophiles vont rejoindre le foyer de l'inflammation en se déplaçant dans cet environnement. Ils vont se déplacer selon le gradient de molécules chimiotactiques pour lesquelles ils disposent de récepteurs membranaires (l'IL-8, le LTB₄, le PAF, le fMLP et le C5a). Pour se déplacer, les neutrophiles vont s'aider de leur arsenal protéolytique et en particulier de l'HNE libre et liée aux membranes et la MMP-9 (Cepinskas *et al.*, 1999 ; Adair-Kirk *et al.*, 2003). Dans un modèle murin d'inflammation induit par le LTB₄, l'inhibition de l'élastase membranaire par un inhibiteur synthétique, le ONO-5046, diminue la réponse inflammatoire. Les neutrophiles sauvages et ceux des souris KO pour la mNE sont recrutés de la même façon au site de l'inflammation. Il existe des mécanismes de compensation qui font intervenir d'autres protéases, en particulier des protéases à sérine car elles sont inhibées par l'aprotinine, un inhibiteur des protéases à sérine à large spectre (Young *et al.*, 2007).

G. La migration trans-épithéliale

Au niveau des poumons, les neutrophiles vont devoir passer la barrière épithéliale pour accéder au foyer de l'inflammation. Pour cela, il va y avoir une désorganisation des jonctions serrées, ce qui provoque une perméabilité transitoire de l'épithélium laissant passer les neutrophiles mais aussi les bactéries et les composants nocifs dans les tissus interstitiels. Cette migration des neutrophiles fait intervenir différents éléments : les intégrines, à la surface des neutrophiles et des cellules épithéliales, les protéases comme les NSPs et les MMPs mais aussi une réorganisation du cytosquelette des cellules épithéliales et des jonctions serrées.

H. La phagocytose et la dégranulation

La phagocytose est un processus de défense immunitaire innée qui va aboutir à l'élimination d'un pathogène et/ou l'élimination de cellules mortes. Trois types cellulaires sont capables de phagocyter les microorganismes et les cellules apoptotiques et/ou nécrotiques : les macrophages, les cellules dendritiques et les neutrophiles. La phagocytose est un processus complexe composé de plusieurs étapes : le chimiotactisme, l'adhésion, l'endocytose et la digestion des pathogènes ingérés.

La première étape de chimiotactisme s'effectue grâce aux cytokines pro-inflammatoires qui ont permis le recrutement des neutrophiles au site de l'inflammation. Les neutrophiles possèdent à leur surface des récepteurs qui vont permettre de capter et d'intégrer ces signaux comme le récepteur au C5a.

L'adhésion du neutrophile au pathogène nécessite la reconnaissance et l'interaction avec ce dernier. L'interaction peut être directe, c'est-à-dire que le neutrophile reconnaît directement les constituants de la paroi bactérienne via ces récepteurs membranaires comme le CD14 et les TLRs ou indirecte par l'intermédiaire d'opsonines qui vont se fixer sur les pathogènes et seront ensuite reconnues par les neutrophiles. Parmi les opsonines, on retrouve les immunoglobulines, les fragments C3b et C3b_i du complément mais également les collectines : les surfactants A et D sécrétés par les pneumocytes de type II (Kuroki *et al.*, 2007). Les neutrophiles possèdent des récepteurs aux fragments C3b et C3b_i appelés CR1 (CD35) et CR3 (CD11b/CD18) et des récepteurs aux fragments Fc des Ig appelés Fcγ-R de faible affinité (CD32) ou de forte affinité (CD64) (Witko-Sarsat *et al.*, 1999 ; Witko-Sarsat *et al.*, 2000 ; Lee *et al.*, 2003).

Après la reconnaissance et la fixation, les neutrophiles vont ensuite endocyter ces pathogènes. Il va y avoir formation d'un phagosome qui renferme les pathogènes. Cette étape s'accompagne d'un changement du métabolisme cellulaire : augmentation de la consommation d'oxygène, de la production d'acide lactique et de la production de NADPH par le cycle des pentoses phosphates. Le NADPH va intervenir dans le métabolisme du glutathion, qui est le principal anti-oxydant intracellulaire. Le glutathion est en effet indispensable pour protéger les neutrophiles des effets délétères des ROS qu'ils produisent. Les granules cytoplasmiques du neutrophile vont alors fusionner avec le phagosome pour former le phagolysosome. C'est dans le phagolysosome que les pathogènes vont être éliminés.

Afin d'éliminer les pathogènes ingérés, les neutrophiles vont combiner deux systèmes distincts mais complémentaires : un système oxydatif et un système non oxydatif. Le système oxydatif fait intervenir la production des ROS comme les ions superoxyde : O₂⁻, le peroxyde d'hydrogène : H₂O₂, l'acide hypochloreux : HClO et les chloramines. Ces différents ROS vont être produits pendant l'explosion oxydative ou « burst oxydatif », dans le phagolysosome par la NADPH oxydase, qui est un complexe multiprotéique. Le complexe de la NADPH oxydase est formé de deux composantes : une composante membranaire, le cytochrome b558 et une composante soluble formée de trois protéines : p67^{phox}, p40^{phox} et p47^{phox}. Le cytochrome b558 est localisé au départ dans les membranes des granules spécifiques et tertiaires. Les autres

composés sont d'origine cytoplasmique. Ce complexe catalyse la formation d'ions O_2^- par réduction de l'oxygène moléculaire (O_2), selon la réaction suivante : $NADPH, H^+ + 2O_2 \rightarrow NADP^+ + 2O_2^- + 2H^+$. Les ions O_2^- peuvent être transformés en H_2O_2 sous l'effet de la SOD. L' H_2O_2 pourra être éliminé par la catalase ou utilisé par la MPO pour former de l' $HClO$ selon la réaction suivante : $H_2O_2 + Cl^- + H^+ \rightarrow H_2O + HClO$. L' $HClO$ est un oxydant puissant possédant une forte activité anti-microbienne. Il peut également oxyder les amines primaires pour donner des oxydants moins puissants, les chloramines (Hampton *et al.*, 1998).

Toutes ces molécules à activités anti-bactériennes sont libérées principalement dans le phagolysosome. Mais dans certaines situations, quand les pathogènes sont de grosse taille ou quand ils s'échappent du phagolysosome, elles vont être libérées dans le milieu extracellulaire et peuvent avoir des conséquences néfastes. En effet, lorsque les défenses naturelles sont saturées, en particulier les anti-oxydants et les inhibiteurs de protéases, ces médiateurs de l'immunité innée vont avoir des effets délétères sur les protéines de la matrice extracellulaire, ainsi que sur les cellules épithéliales environnantes. La libération de médiateurs de l'immunité va entraîner un nouveau recrutement de neutrophiles, de macrophages et de lymphocytes perpétuant ainsi l'état inflammatoire.

I. Libération de médiateurs de l'inflammation

Le gradient de molécules chimiotactiques va attirer les neutrophiles de la circulation sanguine jusqu'au site de l'inflammation. Une fois activés, les neutrophiles vont également libérer des médiateurs de l'inflammation comme des cytokines et/ou des chimiokines pro-inflammatoires comme le $TNF-\alpha$, l' $IL-1-\alpha$, l' $IL-8$ et des facteurs de croissance comme le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (Tableau III) (Witko-Sarsat *et al.*, 2000).

Cytokines pro-inflammatoires	$TNF-\alpha$, $IL-1\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-12$
Cytokines anti-inflammatoires	$IL-1ra$
Chimiokines	$IL-8$, $Gro-\alpha$, $MIP1-\alpha$, $MIP1-\beta$, CINC
Autres cytokines et facteurs de croissance	$IFN-\alpha$, $IFN-\beta$, G-CSF, FasL, CD30L, VEGF

Tableau III : Cytokines libérées par les neutrophiles *in vitro*. FasL : Fas Ligand, CD30L : CD30 Ligand, CINC : Cytokine-INDuced Chemoattractants (D'après Witko-Sarsat, 2000).

La production de cytokines par les neutrophiles va pouvoir être facilement modulée en particulier par les cytokines régulatrices des LT : l'IFN γ et l'IL-10. L'IFN γ va augmenter la production des cytokines chez les neutrophiles alors que l'IL-10 (anti-inflammatoire) va diminuer cette production. Après activation des neutrophiles par du LPS en présence d'IL-10, la production de cytokines pro-inflammatoires est inhibée mais celle de l'IL-1Ra, molécule anti-inflammatoire, est augmentée (Cassatella *et al.*, 1994 ; Witko-Sarsat *et al.*, 2000).

J. L'apoptose et la nécrose

Lorsque les pathogènes sont éliminés, la réponse inflammatoire va diminuer d'intensité. Il va y avoir un équilibre entre les cytokines inflammatoires et anti-inflammatoires. Cet équilibre va diminuer l'expression des intégrines au niveau des cellules endothéliales, ce qui va permettre de diminuer le recrutement des différents leucocytes. Les neutrophiles présents sur le site vont entrer en apoptose et vont être éliminés par phagocytose par les macrophages (Haslett *et al.*, 1999). Contrairement à la nécrose, l'apoptose permet aux neutrophiles de ne pas libérer leurs granules dans le milieu extracellulaire et donc de diminuer l'état inflammatoire. Dans certaines conditions, les neutrophiles vont retarder ce processus apoptotique, faisant persister l'état inflammatoire. En présence des pathogènes comme *P. aeruginosa* et *S. aureus*, les cellules épithéliales vont produire des facteurs de survie pour les neutrophiles comme du G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) et du GM-CSF qui vont inhiber l'entrée en apoptose (Saba *et al.*, 2002).

La phagocytose des neutrophiles apoptotiques par les macrophages est médiée par le complexe CD36-intégrine $\alpha\text{v}\beta 3$ (intégrine $\alpha\text{v}\beta 3$ ou récepteur à la vitronectine) sur les macrophages. Ce complexe va lier la thrombospondine qui est un protéoglycane membranaire, pouvant se lier aux neutrophiles (Savill *et al.*, 1992). Les phosphatidylsérines sont des phospholipides membranaires essentiellement orientés vers l'intérieur de la cellule qui vont se retrouver exposés à la surface des neutrophiles lors de l'apoptose. Ce marqueur apoptotique va être reconnu par les macrophages grâce à des récepteurs spécifiques. Le CD36 participe également à cette reconnaissance. La phagocytose des neutrophiles apoptotiques va entraîner une vive diminution de la production de cytokines inflammatoires comme l'IL-1 β , l'IL-8 et le TNF- α par les macrophages, participant ainsi à la résolution de l'inflammation (Fadok *et al.*, 1998).

K. Les pièges neutrophiliques ou NETs

Les neutrophiles sont les cellules principales de la défense immunitaire innée. Ils possèdent un arsenal anti-microbien important. En plus du mécanisme de phagocytose, de la production d'oxydants et de la libération de peptides cationiques pour éliminer les pathogènes, les neutrophiles sont capables de former des pièges neutrophiliques extracellulaires ou NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*) (Brinkmann *et al.*, 2004). Les NETs préviennent la dissémination microbienne et permettent d'établir des concentrations importantes de substances anti-microbiennes au voisinage des neutrophiles. La production des NETs est contrôlée *in vitro* par différents stimuli comme le PMA (*Phorbol-12-Myristate-13-Acetate*), l'IL-8, l' H_2O_2 , le LPS, les microorganismes, les STBM (*SyngyotioTrophoBlast Microparticules*) et les plaquettes. La formation des NETs s'organise de la façon suivante : une destructuration des lobes nucléaires, une homogénéisation de la chromatine, une désintégration des membranes nucléaires et granulaires permettant la mise en contact des composants formant les NET et finalement leur extrusion dans le milieu extracellulaire après rupture de la membrane plasmique (Brinkmann et Zychlinsky, 2007 ; Clark *et al.*, 2007). Fuchs *et al.* ont montré que la production des NETs par les neutrophiles est associée à la survenue d'une mort cellulaire, indépendante de l'apoptose et de la nécrose (Fuchs *et al.*, 2007). De plus, ce processus actif est dépendant des ROS. En effet, les neutrophiles de patients atteints de granulomatose chronique, qui possèdent une NADPH non fonctionnelle, ne peuvent pas former de NETs après activation par du PMA (Figure 14) (Fuchs *et al.*, 2007).

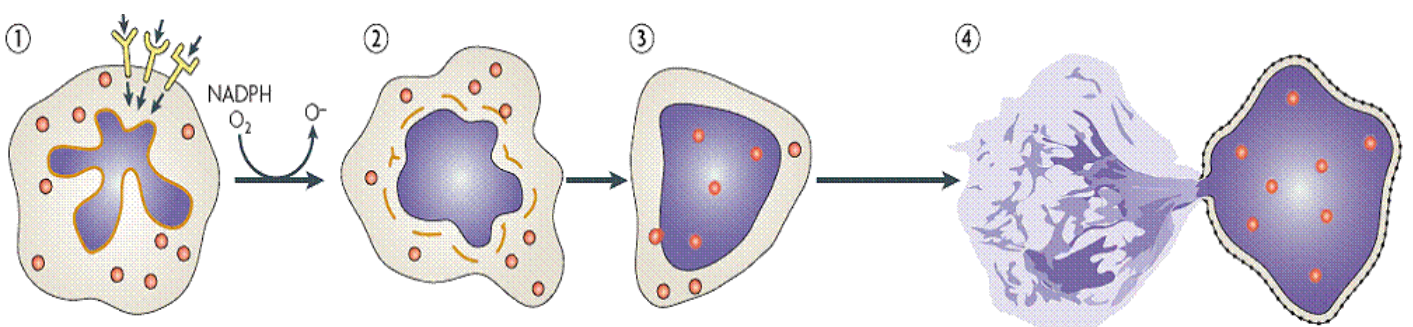


Figure 14 : Les différentes étapes de la formation des NETs. L'activation des neutrophiles par différents stimuli induit la production de ROS (1). L'intégrité des membranes nucléaires et des granules est diminuée (2). Perte de la structure lobulaire du noyau ; le matériel nucléaire se mélange aux contenus des granules dans la cellule (3). Rupture de la paroi cellulaire des neutrophiles et libération des NETs dans le milieu extracellulaire (4) (D'après Brinkmann et Zychlinsky, 2007).

Les NETs sont des filaments d'ADN dans lesquels se mélangent les protéines microbicides contenues dans les différents granules des neutrophiles comme l'HNE, la CatG, la lactoferrine, la gélatinase, le lysozyme, le PGRP-S (*Peptidoglycan Recognition Protein-S*) et des histones qui possèdent également une activité anti-bactérienne (Brinkmann et al., 2004 ; Cho et al., 2005 ; Parseghian et Luhrs, 2006).

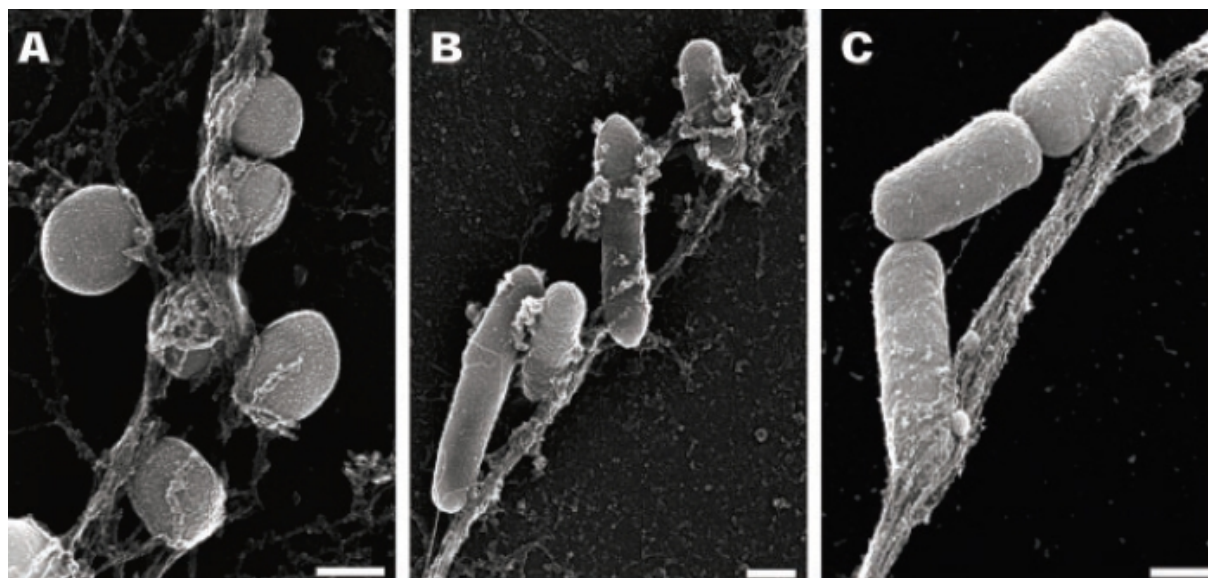


Figure 15 : Observation en microscopie à balayage de bactéries à Gram positif et négatif piégées dans les NETs. (A) *S. aureus*, (B) *S. Typhimurium*, (C) *S. flexneri*. Les barres d'échelle représentent 500 nm (D'après Brinkmann et al., 2004).

Les NETs sont capables de piéger les bactéries à Gram positif et négatif. Les enzymes piégées dans les NETs sont actives et sont capables de dégrader les facteurs de virulence des bactéries comme l'IpaB (*Invasion plasmid antigen B*) de *Shigella flexneri* (*S. flexneri*) ou la toxine alpha de *S. aureus* (Brinkmann et al., 2004). Les NETs piègent également les pathogènes eucaryotes comme les levures *C. albicans* (Urban et al., 2006) (Figure 15).

Certaines bactéries piégées vont cependant pouvoir s'échapper de ces filaments d'ADN. Les bactéries comme les *Streptococcus* produisent des désoxyribonucléases (DNase) qui vont dégrader l'ADN. Les pneumocoques, *S. pneumoniae*, possèdent à leurs surfaces une DNase, appelée EndA. L'activité de EndA permet à ces souches piégées dans les NETs de s'échapper afin d'éviter d'être détruites (Beiter et al., 2006). De même, les Streptocoques du groupe A ou GAS (*Group A Streptococcus*) sécrètent une DNase, appelée Sda1, qui leur permet de survivre aux NETs (Buchanan et al., 2006). Les bactéries à Gram positif utilisent un autre système qui leur permet d'échapper aux NETs. En effet, les bactéries comme *S.*

aureus et *Listeria monocytogenes* possèdent l'opéron *dtl* composé de quatre gènes *dtlA*, *dtlB*, *dtlC* et *dtlD* qui permettent l'incorporation de résidus D-Alanine dans les LTA associés aux membranes (Peschel *et al.*, 1999 ; Abachin *et al.*, 2002 ; Weidenmaier et Peschel, 2008). Cette incorporation de résidus D-Alanine dans les LTA va diminuer le nombre de charges négatives à la surface et ainsi conférer une résistance aux peptides cationiques. En 2007, Wartha *et al.* ont montré que l'incorporation de résidus D-Ala dans les LTA des pneumocoques augmente la résistance de ces bactéries aux NETs (Wartha *et al.*, 2007a, b).

Les NETs ont été observés *in vivo* chez les femmes enceintes développant une pré-éclampsie, une pathologie inflammatoire caractérisée par des lésions de l'endothélium des capillaires et des vaisseaux sanguins, en particulier au niveau des reins (Gupta *et al.*, 2006 ; Gupta *et al.*, 2007) et dans différents modèles animaux d'infection comme chez les poissons zèbres (*Danio rerio*) (Palic *et al.*, 2007) et les bovins (Grinberg *et al.*, 2008). Clark *et al.* ont montré que le plasma de patients atteints de sepsis induit l'interaction entre les plaquettes et les neutrophiles conduisant à la formation de NETs (Clark *et al.*, 2007). Cette libération d'ADN, pour piéger les pathogènes, a également été mise en évidence chez les mastocytes. Appelés MCETs (*Mast Cell Extracellular Traps*), ils contiennent de la chromatine mais également des protéines anti-microbiennes comme la tryptase, des histones, la LL-37 et sont induits par le PMA, l' H_2O_2 et les pathogènes. La production de ces MCETs est, comme les NETs, dépendante des ROS (von Köckritz-Blickwede *et al.*, 2008).

La production de NETs est un nouveau mécanisme de défense, indépendant de la phagocytose, qui place les neutrophiles au centre de la lutte anti-microbienne. Mais des études récentes ont suggéré que l'exposition prolongée d'ADN et des protéines nucléaires comme les histones, associées à des bactéries, puisse aussi participer à l'induction de maladies auto-immunes (Baker *et al.*, 2008 ; Neeli *et al.*, 2008). Une autre étude a montré que les NETs peuvent être utilisés comme un nouveau marqueur d'inflammation et de sepsis post-traumatique, mais ces résultats restent à confirmer (Margarf *et al.*, 2008).

L. La résolution/perpétuation de la réaction inflammatoire

Le recrutement des neutrophiles aboutit à l'élimination des pathogènes par phagocytose, à la diminution de la concentration en produits bactériens dans les voies aériennes et finalement à la diminution de la production de cytokines inflammatoires et de composés toxiques par les neutrophiles, les macrophages et les cellules épithéliales. Mais, si l'infection est prise en charge tardivement ou est trop importante, le processus inflammatoire

ne sera pas suffisant pour éliminer les pathogènes et va persister. Les dommages tissulaires vont donc augmenter à cause des effets délétères des protéases libérées en grande quantité, en particulier des NSPs, et des radicaux libres générés par les neutrophiles. Ces dommages tissulaires vont entraîner un affaiblissement des défenses pulmonaires. Dans ces conditions, la persistance de l'état inflammatoire va engendrer de graves conséquences sur l'épithélium bronchique et donc sur la capacité respiratoire.

Chapitre III : Les protéases à sérine de neutrophiles et leurs différentes fonctions.

I. Rôle de la balance protéases/anti-protéases dans la physiopathologie pulmonaire

Les protéases du neutrophile jouent un rôle déterminant dans la réponse inflammatoire. Elles interviennent dans la migration, l'activité anti-microbienne, le remodelage du tissu pulmonaire ou encore dans l'activation et/ou l'inactivation des cytokines (Pham, 2008). Cependant, leurs activités protéolytiques doivent être contrôlées, lorsqu'elles sont libérées dans le milieu extracellulaire. Pour cela, un écran de protection, composé d'inhibiteurs principalement, va se former. Cet écran sera d'autant plus important que l'activité protéolytique augmente. La balance entre les protéases et leurs inhibiteurs doit être à l'équilibre afin que les protéases puissent jouer leur rôle sans engendrer d'effets délétères.

Le déséquilibre de la balance protéase/anti-protéase peut expliquer le développement et l'aggravation de nombreuses pathologies inflammatoires pulmonaires. Un déséquilibre de cette balance en faveur des inhibiteurs entraîne un excès de dépôt de matrice extracellulaire au niveau de la paroi des voies aériennes. L'asthme est caractérisé par un excès d'inhibiteurs des MMPs, comme le TIMP-1, par rapport à la MMP-9. Ce déséquilibre est corrélé à des difficultés respiratoires dues à un excès de dépôt de collagène et l'apparition de fibrose (Vignola *et al.*, 2008). A l'inverse, d'autres pathologies comme le SDRA et les BPCO sont caractérisées par un excès d'activité élastinolytique, en particulier due à l'HNE, par rapport aux inhibiteurs endogènes comme l' α 1-PI. La protéolyse exacerbée de l'élastine, constituant majeur des poumons et nécessaire pour son élasticité, engendrée par la dérégulation de la balance élastase/anti-élastase participe à l'altération de la fonction respiratoire. Le recrutement massif de neutrophiles au site de l'inflammation et la libération d'une grande quantité d'HNE est à l'origine de ce déséquilibre (Owen et Campbell, 1999). Les effets délétères de la dérégulation de la balance protéases/anti-protéases, en particulier la dégradation excessive du tissu pulmonaire, sont également responsables de l'amplification de la réaction inflammatoire et de son maintien.

II. Les protéases à sérine du neutrophile

A. Généralités

D'une manière générale, les protéases sont classiquement regroupées selon leur mécanisme catalytique. Il existe quatre grandes classes de protéases : les protéases à sérine, les protéases à cystéine, les protéases acides et les MMPs. Le nom des trois premières classes fait référence à la nature de l'acide aminé impliqué dans le mécanisme catalytique (Ser, Cys et Asp, respectivement). La classe des MMPs fait référence aux ions métalliques nécessaires à leur activité enzymatique. Les neutrophiles possèdent dans leurs granules des enzymes avec des activités collagénolytiques et élastinolytiques. Sept protéases ont été décrites à ce jour parmi lesquelles 3 MMPs : les pro-MMP-8, pro-MMP-9 et la pro-leucolysine contenues dans les granules secondaires, tertiaires et les vésicules sécrétrices, décrites précédemment et 4 protéases à sérine : la pro-uPA contenue dans les granules secondaires et tertiaires et les trois serprocidines : l'HNE, la Pr3 et la CatG contenues dans les granules azurophiles. On retrouve également la Pr3 dans les granules secondaires et les vésicules sécrétrices (Witko-Sarsat *et al.*, 1999). Ces trois protéases sont stockées sous formes actives dans les granules azurophiles, en très grande concentration, de l'ordre du millimolaire.

Les gènes codant l'HNE (*Ela2*), la Pr3 (*PRTN3*) et l'azurocidine (*AZU1*), qui est la quatrième serprocidine inactive également stockée dans les granules azurophiles, sont localisés sur le chromosome 19 au niveau du locus 19p13.3 (Zimmer *et al.*, 1992 ; Sturrock *et al.*, 1993). Le gène de la CatG (*CTSG*) est localisé sur le chromosome 14 au niveau du locus 14q11.2, à proximité des gènes codant pour les granzymes B et H, avec lesquels la CatG possède une forte identité de séquence (Hohn *et al.*, 1989). Les granzymes B et H sont des protéases à sérine contenues dans les granules des LT cytotoxiques.

Les trois gènes des NSPs sont transcrits dans la même orientation et sont composés de cinq exons et de quatre introns. Les trois résidus, conservés, de la triade catalytique (Asp, Ser, His), sont codés par trois exons différents. Le gène de la Pr3 (6,57 kb) est plus grand que ceux de l'HNE et de la CatG (4 et 2,7 kb, respectivement) en raison de la taille des introns I et III. L'expression de ces trois protéases est maximale et étroitement régulée par les mêmes facteurs de transcription au stade promyélocyte du développement (Faurschou et Borregaard, 2003 ; Lennartsson *et al.*, 2005). Outre les neutrophiles, d'autres cellules sont capables de produire ces enzymes. En effet, une sous-population monocyttaire avec un phénotype (P) pour pro-inflammatoire exprime les trois protéases après recrutement au site de l'inflammation

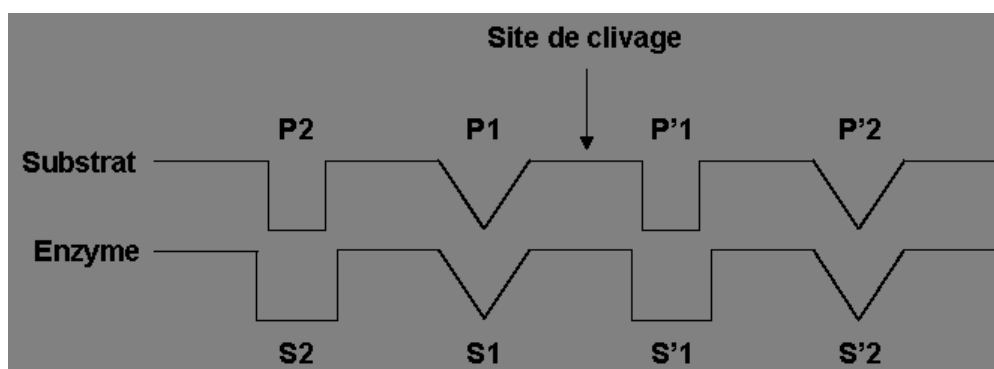
(Owen *et al.*, 1994a, b). La CatG est exprimée par les mastocytes (Caughey, 2007), la Pr3 est exprimée par des cellules épithéliales buccales (Uehara *et al.*, 2004) et l'HNE exprimée dans des lignées de cellules myéloïdes leucémiques, dans lesquelles elle joue un rôle important (Lane et Ley, 2003 ; Goulet *et al.*, 2008).

Ces trois protéases ont deux devenir distincts après l'activation des neutrophiles. Une grande quantité va être libérée dans le milieu extracellulaire et une partie va s'associer aux membranes. La phagocytose, la lyse cellulaire (nécrose), l'exposition à des complexes immuns, à des particules opsonisées ou à différents agents pharmacologiques (comme la cytochalasine B ou le ionophore calcique, les esters de phorbol) vont entraîner la sécrétion de ces protéases dans le milieu. En revanche, le TNF- α , les chimioattractants comme le PAF, l'IL-8, le fMLP ou le LPS conduisent à une rapide mobilisation des granules azurophiles à la membrane des neutrophiles et à l'association membranaire des protéases à sérine (Owen et Campbell, 1999).

Les NSPs liées à la membrane plasmique des neutrophiles sont catalytiquement actives et peuvent hydrolyser les constituants de la matrice extracellulaire (Owen et Campbell, 1999 ; Campbell *et al.*, 2000). Ces trois protéases vont se fixer différemment à la membrane. En effet, pour l'HNE et la CatG, ce sont des interactions électrostatiques avec des protéoglycanes sulfatés de surface, comme les chondroïtines sulfates et les héparanes sulfates, qui sont mises en jeu (Campbell et Owen, 2007). L'HNE peut également être associée à l'intégrine CR3 (CD11b/CD18 ou Mac1) par des interactions électrostatiques (Cai et Wright, 2005 ; Zimmermann *et al.*, 2005). En ce qui concerne la Pr3, le mode de fixation est un peu moins clair. Il a d'abord été décrit que la Pr3 pouvait s'associer via des interactions covalentes ou s'insérer dans la bicouche lipidique (Goldmann *et al.*, 1999 ; Witko-Sarsat *et al.*, 1999). Comme pour l'HNE, la Pr3 peut également être associée à l'intégrine CD11b/CD18 par des interactions électrostatiques (David *et al.*, 2005). En 2006, il a été montré que la Pr3 se retrouvait dans des complexes de haute masse moléculaire avec le récepteur Fc γ RIIIb et le CD11b/CD18 (Fridlich *et al.*, 2006). En 2007, une étude a montré que la Pr3 pouvait être associée à la scramblase 1, une enzyme impliquée dans le flip-flop des lipides membranaires (Kantari *et al.*, 2007). Enfin, une étude récente, *in silico*, a montré que les interactions entre la Pr3 et la membrane lipidique sont principalement dues à des interactions hydrophobes (Hajjar *et al.*, 2008). Les neutrophiles non activés possèdent une faible quantité d'HNE, de Pr3 et de CatG à leurs surfaces (Owen et Campbell, 1999). Bien que très proches d'un point de vue de leur séquence en acides aminés et de leur structure tridimensionnelle, ces trois protéases vont

présenter des spécificités de substrat, des sensibilités aux inhibiteurs et des propriétés biologiques différentes (Korkmaz *et al.*, 2008).

La spécificité de substrat de ces trois protéases va dépendre des résidus des chaînes latérales des acides aminés situés dans les sous-sites du site actif des enzymes et dans les boucles de surface autour de ce site. Ces sous-sites vont participer aux interactions enzyme-substrat, vont moduler l'affinité de l'enzyme pour le substrat et vont jouer un rôle dans la stabilisation du complexe enzyme-substrat. La nomenclature de Schechter et Berger est largement utilisée pour décrire les interactions entre une protéase et son substrat (Schechter et Berger, 1967). Dans cette nomenclature, les sous-sites de l'enzyme sont nommés S (Sous-sites) et les résidus du substrat qui interagissent avec la protéase sont appelés P (Peptide). Par convention, les deux acides aminés qui entourent le site de clivage sont désignés P1 (en amont de la liaison clivée) et P'1 (en aval de la liaison clivée). Ainsi, les résidus du côté N-terminal du résidu P1 sont appelés P2, P3, ..., Pn et les résidus du côté C-terminal du résidu P'1 sont appelés P'2, P'3, ..., P'n. Lors de la formation du complexe enzyme-substrat, les résidus P du substrat vont interagir avec les sous-sites S correspondants. Ainsi, l'interaction enzyme-substrat selon Schechter et Berger peut être résumée de la façon suivante :



Les protéases à sérine (EC.3.4.21.-) représentent un tiers des protéases identifiées à ce jour chez les eucaryotes, les procaryotes, les bactéries et les archéobactéries. Ces protéases sont divisées en plusieurs clans, référencés dans la base de données MEROPS (MEROPS the Peptidase Database, <http://merops.sanger.ac.uk>). Les clans les plus représentés sont ceux de la chymotrypsine (clan SA) et de la subtilisine (clan SB). La plupart des protéases à sérine des mammifères appartiennent au clan SA comme la chymotrypsine, la trypsine, et les NSPs. Le mécanisme catalytique est assuré par une triade catalytique généralement conservée dans un clan. Pour les NSPs, la triade catalytique est composée des résidus His, Ser et Asp, comme pour la chymotrypsine et la subtilisine. La réaction d'hydrolyse des liaisons peptidiques fait intervenir une réaction d'acylation suivie d'une déacylation. La spécificité d'hydrolyse des protéases à sérine est étroitement liée à la nature du résidu situé en P1 dans le substrat. Ainsi,

on peut distinguer les enzymes de type trypsine ou « trypsin-like » (résidu basique en P1), les enzymes de type chymotrypsine ou « chymotrypsin-like » (résidu aromatique en P1) et les enzymes de type élastase ou « elastase-like » (petit résidu en P1).

B. L'élastase leucocytaire (HNE)

1. Structure et propriétés physico-chimiques (Tableau IV)

L'HNE (EC.3.4.21.37) est synthétisée sous la forme d'un précurseur de 267 acides aminés. Le peptide signal de 27 résidus va être clivé au niveau du réticulum endoplasmique lors de la traduction de la protéine par la peptidase signal. Il va rester un prodiptide Ser-Glu en N-terminal. Ce prodiptide permet de maintenir la proHNE sous une forme inactive. Ce prodiptide va être clivé par une protéase à cystéine lysosomale appelée cathepsine C ou DPPI (*DiPeptidyl Peptidase I*) ce qui permettra de rendre la protéase active. Le C-terminal consiste en un peptide de 20 résidus qui va être clivé par une protéase encore inconnue à ce jour. Pour l'adressage des protéases aux granules azurophiles, la protéine cargo AP-3 (*Adaptator Protein-3*) est importante. Cette protéine va prendre en charge l'HNE néo-synthétisée du Golgi jusqu'aux granules primaires. L'absence de clivage du peptide C-terminal serait à l'origine d'une relocalisation de l'HNE à la membrane plasmique et non dans les granules primaires (Benson *et al.*, 2003). De plus les serglycines, qui sont les protéoglycanes intracellulaires les plus nombreux, semblent être essentiels à la localisation de l'HNE dans les granules (Lemansky *et al.*, 2007). Les mécanismes mis en place pour l'adressage et le trafic intracellulaire de la Pr3 et la CatG semblent être différents et sont inconnus à ce jour.

L'HNE est une glycoprotéine de 218 acides aminés, d'environ 30 kDa, composée d'une chaîne peptidique comportant quatre ponts disulfure (Cys26-Cys42, Cys122-Cys179, Cys132-Cys158 et Cys169-Cys194). Elle contient environ 20% d'oses neutres, une faible quantité d'acides sialiques et deux sites de N-glycosylation au niveau des résidus Asn109 et Asn159. La nature des chaînes glycosidiques permet d'identifier 3 isoformes en SDS-PAGE de 29-31-32 kDa. L'HNE contient 19 résidus Arg, aucune Lys pour seulement 9 résidus acides ce qui confère à la protéase un *pI* de 10,5. Parmi ces 19 résidus Arg, 18 d'entre eux forment des clusters basiques à la surface de l'enzyme. La structure tridimensionnelle de l'HNE a été établie pour la première fois par cristallographie aux rayons X, à partir de complexes formés avec le troisième domaine inhibiteur de l'ovomucoïde de dinde (Bode *et al.*, 1986). Elle a été par la suite co-cristallisée avec de petits inhibiteurs synthétiques de type

chlorométhylcétone tels que le MeO-Suc-Ala₂-Pro-Val-CH₂Cl et le MeO-Suc-Ala₂-Pro-Ala-CH₂Cl (Wei *et al.*, 1988 ; Navia *et al.*, 1989). La structure tertiaire de l'HNE se présente en deux domaines, organisés chacun en tonneau β anti-parallèle comme toutes les protéases à sérine du clan SA. Le site actif, où se retrouve la triade catalytique His41-Asp88-Ser173, est situé dans le sillon formé par les 2 tonneaux β. Le site de liaison du substrat est localisé le long de ce sillon et inclut chacun des deux domaines dans l'interaction de l'enzyme avec son substrat (Figure 16).

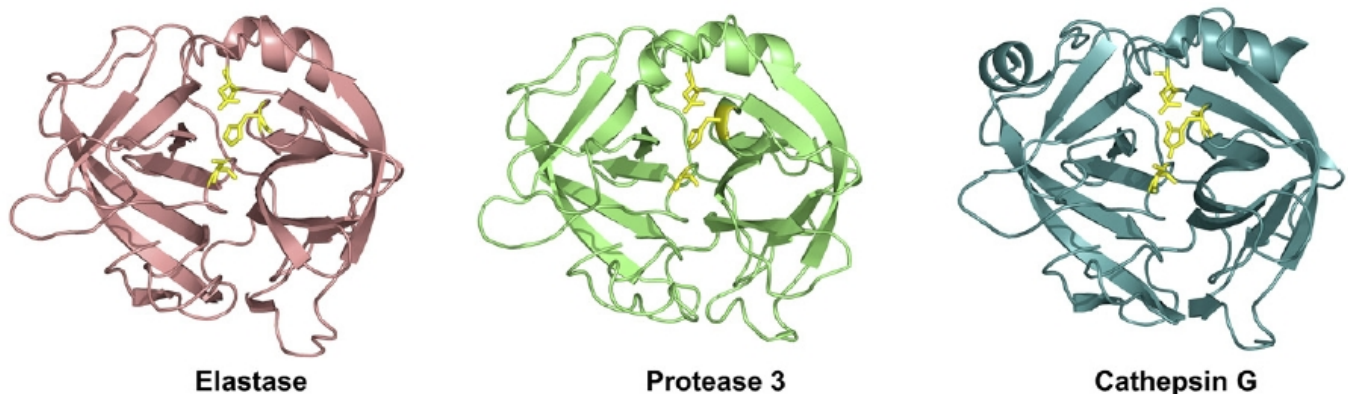


Figure 16 : Représentation en ruban des structures tridimensionnelles de l'élastase leucocytaire (HNE, code PDB :1PPF), de la protéase 3 (Pr3, code PDB : 1FUJ) et de la cathepsine G (CatG, code PDB : ICGH). Les chaînes latérales des acides aminés de la triade catalytique de chaque enzyme sont colorées en jaune. (D'après Korkmaz *et al.*, 2008).

2. Activité et spécificités enzymatiques

L'HNE est une protéase dont le pH optimum est compris entre 8 et 8,5 et dont l'activité va dépendre de la force ionique et de l'hydrophobicité des solvants (Lestienne et Bieth, 1980). Contrairement à beaucoup de protéases, l'HNE est capable d'hydrolyser et de solubiliser l'élastine insoluble, riche en acides aminés non polaires. L'élastine est une protéine du parenchyme pulmonaire qui permet d'assurer l'élasticité pulmonaire. Elle est composée d'environ 26% de résidus Ala et 13% de résidus Val. L'HNE va accommoder préférentiellement des petits résidus en P1, due notamment aux trois résidus qui forment la poche S1 : Val190, Val216 et Asp226 (Bode *et al.*, 1986). Elle peut également cliver des substrats après des cystéines et des sérines comme dans la chaîne β de l'insuline, lorsque celle-ci est oxydée (Blow, 1977 ; Blow et Barrett, 1977). Néanmoins, une préférence plus importante pour les résidus Val en P1 plutôt que les résidus Ala explique pourquoi l'HNE est moins efficace pour hydrolyser l'élastine que l'élastase pancréatique porcine ou PPE (*Porcine Pancreatic Elastase*), qui accommode préférentiellement des résidus Ala en P1 (Senior *et al.*, 1977). La poche S2 est légèrement hydrophobe et la poche S'1 est quant à elle hydrophobe.

L'activité enzymatique de l'HNE peut être suivie avec des substrats chromogéniques comme MeOSuc-Ala₂-Pro-Val-NHPhNO₂, MeOSuc-Ala₃-NHPhNO₂ ou encore MeOSuc-Ala₂-Pro-Val-pNA. Des études ont montré que l'activité de l'HNE augmentait avec la longueur des substrats synthétiques, suggérant ainsi que l'HNE présente un site de fixation du substrat étendu (Lestienne et Bieth, 1980). Plusieurs substrats de l'HNE, du type Abz-peptidyl-EDDnp à extinction interne de fluorescence, ont été développés au laboratoire. Le plus sensible et le plus spécifique d'entre eux est le substrat Abz-APEEIMRRQ-EDDnp dont la séquence dérive de la serpine PAI-1, inhibiteur de l'uPA (Korkmaz *et al.*, 2004).

C. La protéase 3 (Pr3)

1. Structure et propriétés physico-chimiques (Tableau IV)

La Pr3 (EC.3.4.21.76), également appelée myéloblastine, est synthétisée sous forme d'un précurseur de 256 acides aminés. Comme pour l'HNE, la Pr3 va subir 3 clivages successifs pour atteindre sa conformation active. En effet, la peptidase signal va cliver le peptide signal de 25 résidus, puis le prodiptide Ala-Glu va être clivé par la DPPI, pour donner une Pr3 active. L'extension C-terminale de 8 résidus sera libérée pour donner la forme mature de 222 acides aminés (Korkmaz *et al.*, 2008). La Pr3 mature comporte deux sites potentiels de N-glycosylation et quatre ponts disulfure. Elle présente 54% d'identité de séquence avec l'HNE et une plus faible quantité en résidus Arg, ce qui explique son *pI* de 9,5, inférieur à celui de l'HNE. Contrairement à l'HNE et la CatG, la Pr3 est également exprimée dans les granules secondaires et les vésicules sécrétrices (Witko-Sarsat *et al.*, 1999). En SDS-PAGE, comme pour l'HNE, 3 isoformes peuvent être détectés (de 29 à 32 kDa) selon la nature de la chaîne hydrocarbonée. Une petite quantité de proPr3 est libérée lors de la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques. Cette proPr3 pourrait constituer un rétrocontrôle négatif de la granulopoïèse (Skold *et al.*, 1999). La structure tridimensionnelle de la Pr3, établie par cristallographie aux rayons X est très similaire à celle de l'HNE. Le sillon formé par les deux domaines en tonneau β contient le site catalytique de l'enzyme dans lequel vient se fixer le substrat (Fujinaga *et al.*, 1996) (Figure 16).

Dans l'environnement acide des granules azurophiles, la Pr3 présente une conformation inactive. Lors de la translocation dans un milieu à pH neutre, la Pr3 subit un changement conformationnel vers une forme active. Cette activation pH-dépendante n'a été décrite que pour la Pr3 (Baici *et al.*, 1996). Les propriétés hydrophobes de la Pr3 lui permettent de s'insérer dans les membranes lipidiques artificielles en conservant son activité

enzymatique. Cette insertion impliquerait un pôle hydrophobe constitué des résidus Phe166, Ile217, Leu223 et Phe224 (Goldmann *et al.*, 2008).

2. Activité et spécificités enzymatiques

Le pH optimal de la Pr3 est environ de 8. La Pr3 accommode préférentiellement les petits résidus aliphatiques en P1, comme l'HNE. Cette ressemblance résulte du haut niveau de similarité qui existe entre les deux protéases au niveau de la séquence du site de fixation du substrat, même si ce site est plus polaire pour la Pr3 (S4-S'3) (Fujinaga *et al.*, 1996). Au fond de la poche S1, la Val190 présente chez l'HNE est remplacée par une Ile chez la Pr3, ce qui en réduit sa taille. Ce phénomène est amplifié par la substitution de l'Ala213 par un Asp. En effet, le groupement carboxylique est dirigé vers l'intérieur de la molécule où il interagit avec une molécule d'eau interne. Ainsi, l'Asp213 ne peut pas donner à la poche S1 une spécificité pour les résidus basiques. De plus les poches S2, S'1 et S'3 de la Pr3 se trouvent aux alentours d'acides aminés chargés qui ne sont pas présents chez l'HNE.

Une proline en P2 favorise l'hydrolyse du substrat par la Pr3 alors que cette position n'influence pas l'hydrolyse du substrat chez l'HNE. Bien que les poches S2 de la Pr3 et l'HNE soient identiques, l'étude des potentiels électrostatiques de surface montre que la poche S2 de la Pr3 est plus polaire que celle de l'HNE (Hajjar *et al.*, 2006 ; Korkmaz *et al.*, 2007). Cette caractéristique est due à la substitution du résidu Leu99 dans l'HNE en Lys dans la Pr3. Le résidu P3 du substrat est principalement exposé au solvant, c'est pourquoi ce résidu n'interviendrait pas dans l'interaction enzyme-substrat. Dans le voisinage de S4, la substitution de Leu99 chez l'HNE par une Lys chez la Pr3 rend la poche S4 plus petite et plus polaire (Fujinaga *et al.*, 1996).

Les résidus P' du substrat favorisent le positionnement correct du substrat dans le site catalytique de la Pr3 et augmentent son activité (Koehl *et al.*, 2003). La spécificité des résidus P'1 et P'3 pour l'HNE et la Pr3 est probablement influencée par l'Asp61. Dans la Pr3, la boucle contenant ce résidu est sensiblement déplacée pour positionner sa chaîne latérale vers les poches S'1 et S'3, les rendant ainsi plus petites et plus polaires que celles de l'HNE. Dans la poche S'2, la substitution des Leu143 et Ile151 dans l'HNE par une Arg et une Pro, respectivement, rend cette poche plus polaire dans la Pr3.

Pour mesurer l'activité enzymatique de la Pr3, les substrats synthétiques suivants peuvent être utilisés : Boc-Ala-OphNO₂, MeOSuc-Ala²-Pro-Val-NHPhNO₂ ou MeOSuc-Lys-(pico)-Ala-Pro-Val-TBE. Des substrats fluorogéniques de type Abz-peptidyl-EDDnp, sensibles et spécifiques de la Pr3 ont été développés au laboratoire. Le meilleur d'entre eux

est le substrat Abz-VADCADQ-EDDnp dont la séquence peptidique dérive de la serpine CrmA (*Cytokine response modifier A*) (Korkmaz *et al.*, 2004). Une étude plus récente a permis de développer des substrats plus spécifiques. Le substrat Abz-VADnVCADYQ-EDDnp (nV : norValine) a un k_{cat}/K_m de 7000 mM⁻¹.s⁻¹, valeur dix fois supérieure à celle du substrat précédent dont le k_{cat}/K_m est de 650 mM⁻¹.s⁻¹. La Pr3 clive les mêmes substrats que les caspases 1 et 3 comme le NF-κB, p21 et la proIL-18. En effet, les résidus Asp en position P4 et P1 dans les substrats de la caspase 3, se superposent aux Asp en position P2 et P'2 des substrats de la Pr3 (Korkmaz *et al.*, 2007). Cette spécificité enzymatique confère à la Pr3 des propriétés pro-apoptotiques que n'a pas la CatG (Pendergraft *et al.*, 2004 ; Wiedow et Meyer-Hoffert, 2005). L'HNE possède des propriétés pro-apoptotiques car elle peut également cliver le NF-κB mais pas au même site que la Pr3 (Preston *et al.*, 2002).

D. La cathepsine G (CatG)

1. Structure et propriétés physico-chimiques (Tableau IV)

Comme pour l'HNE et la Pr3, la CatG est synthétisée sous la forme d'une préproenzyme de 255 acides aminés, constituée d'un peptide signal de 25 résidus qui sera clivé par la peptidase signal, d'un prodiptide Gly-Glu qui sera clivé par la DPPI, pour donner une CatG active et une extension C-terminale de 12 résidus qui sera clivée pour donner une CatG mature, stockée exclusivement dans les granules azurophiles comme l'HNE. La CatG présente 37% d'identité de séquence avec l'HNE, une masse d'environ 28,5 kDa. Elle ne comporte que 3 ponts disulfure (Cys29-Cys45, Cys122-Cys197 et Cys152-Cys176) comme le granzyme B et la chymase. La CatG possède un seul site de N-glycosylation (Asn51) et présente 4 isoformes qui diffèrent selon la nature de la chaîne glycosidique liée. La CatG est la protéase à sérine de neutrophile avec le *pI* le plus élevé. Elle possède 3 résidus Lys et 34 résidus Arg contre 9 résidus Asp pour un *pI* de 12 (Korkmaz *et al.*, 2008). La structure tridimensionnelle de la CatG a été établie par cristallographie aux rayons X, à partir de deux complexes de l'enzyme avec des inhibiteurs de type phosphonate Suc-Val-Pro-PheP-(OPh)₂ (Hof *et al.*, 1996) et Suc-Val-Pro-LysP-(OPh)₂ (code PDB : 1au8). Comme l'HNE et la Pr3, la CatG est composée de deux domaines en tonneau β structuralement similaires, à la surface desquels se situe le site actif (Figure 16).

2. Activité et spécificités enzymatiques

La CatG présente une préférence pour les résidus Leu, Phe ou Tyr en P1. Outre sa spécificité de type chymotrypsine (clivage en C-ter des résidus aromatiques), elle présente également une activité de type trypsine (clivage en C-ter des résidus basiques) (Polanowska *et al.*, 1998 ; Réhault *et al.*, 1999). La spécificité enzymatique de la CatG peut être influencée par la présence de trois résidus basiques à proximité du site actif (Lys217, Lys192 et Arg41) (Korkmaz *et al.*, 2008).

Les meilleurs substrats de CatG possèdent un résidu Phe ou Leu en P1 et une Pro en P2 qui, comme pour la Pr3, permet d'ajuster le substrat dans le site actif de l'enzyme (Polanowska *et al.*, 1998 ; Réhault *et al.*, 1999). Le Glu226 se trouve dans le fond de la poche S1 et divise cette poche en deux parties. Les deux oxygènes du groupement carboxylique interagissent avec l'Ala190 en formant deux liaisons hydrogène. Le P1 de l'inhibiteur cristallisé avec la CatG est une Phe qui interagit, via son cycle aromatique, avec le Glu226 par des interactions électrostatiques. La poche S1, plus grande que celles de l'HNE et de la Pr3, est suffisamment grande pour accommoder un résidu aromatique en P1 et pourrait également accommoder un résidu basique qui interagirait avec le Glu226 comme le fait la Phe en P1 de l'inhibiteur (Hof *et al.*, 1996 ; Réhault *et al.*, 1999). La chaîne latérale de l'Arg41 (Phe pour l'HNE et la Pr3) est flexible et exposée au niveau du site actif, ce qui fait que la CatG accommodera plus facilement des résidus acides en P'2 et P'3. Un résidu Thr ou Val en P3 favorise le clivage du substrat par la CatG alors que les résidus basiques ne peuvent pas être accommodés en raison de la présence de la Lys192 dans la poche S3. La nature du résidu P4 n'influence pas l'activité enzymatique de la CatG. Les meilleurs substrats fluorogéniques développés au laboratoire sont Abz-EPFWEDQ-EDDnp et Abz-TPFSGQ-EDDnp. Ces deux substrats sont suffisamment sensibles et spécifiques pour détecter l'activité enzymatique de la CatG à une concentration inférieure à 10^{-9} M (Attucci *et al.*, 2002).

	ELASTASE	PROTEASE 3	CATHEPSINE G
Classification	EC 3.4.21.37	EC 3.4.21.76	EC 3.4.21.20
Localisation et structure du gène	19p13.3, 5 exons 4 introns	19p13.3, 5 exons 4 introns	14q11.2, 5 exons 4 introns
Nombre d'acides aminés	218	222	235
Masse moléculaire (kDa)	29-33	29-32	28,5
pI	~10,5	~9,5	12
Sites de glycosylation	2	2	1
Nombre de ponts disulfure	4	4	3
pH optimum d'activité	8-8,5	~8	~7,5
Spécificité de substrat	Petits résidus hydrophobes en P1: Val, Cys, Ala, Met, Ile, Leu, Ser	Petits résidus hydrophobes en P1: Val, Cys, Ala, Met, Leu, Ser	Résidus aromatiques ou chargés en P1: Phe, Tyr, Lys, Arg
Meilleur substrat synthétique	Abz-APPEIMRRQ-EDDnp	Abz-VADCRDRQ-EDDnp	Abz-EPFWEDQ-EDDnp
Localisation dans les neutrophiles	Granules azurophiles A la surface des neutrophiles après activation	Granules azurophiles Granules spécifiques Vésicules sécrétrices A la surface des neutrophiles non activés et après activation	Granules azurophiles A la surface des neutrophiles après activation
Source de protéases	Neutrophiles Mastocytes Monocytes Eosinophiles	Neutrophiles Mastocytes Monocytes Basophiles	Neutrophiles Monocytes
Inhibiteurs endogènes	α 2M α 1-PI/MNEI/PI6/PI9 SLPI/élafine/trappine-2	α 2M α 1-PI/MNEI élafine/trappine-2	α 2M ACT/MNEI/ α 1-PI/PI6/SCCA2 SLPI

Tableau IV°: Caractéristiques biochimiques principales de l'HNE, de la Pr3 et de la CatG. (D'après Korkmaz *et al.*, 2008).

III. Les propriétés biologiques des protéases à sérine de neutrophiles

Les NSPs possèdent de multiples propriétés biologiques. De par leurs activités protéolytiques variées, elles vont hiérarchiser, organiser et orienter la réponse immunitaire et inflammatoire. Elles sont impliquées, de ce fait, dans de nombreuses pathologies inflammatoires : pulmonaires (Barnes, 2008a), vasculaires (Fontaine *et al.*, 2004 ; Leclercq *et al.*, 2007) et articulaires comme l'arthrite rhumatoïde (Haynes, 2007).

Les NSPs sont nécessaires pour le maintien de l'homéostasie tissulaire mais elles peuvent également intervenir dans la perpétuation de l'état inflammatoire (Nathan, 2006 ; Pham, 2006 ; Pham, 2008).

A. La défense anti-microbienne

L'HNE joue un rôle essentiel dans l'élimination des bactéries à Gram négatif. Les souris déficientes en élastase (mNE^{-/-}) sont beaucoup plus sensibles aux infections à *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) (Belaouaj *et al.*, 1998). L'HNE et la mNE ciblent une protéine de *E. coli*, la protéine de surface OmpA (*Outer membrane protein A*), qui joue un rôle important dans la structure de la membrane externe des bactéries (Belaouaj *et al.*, 2000). De plus, seule l'HNE est capable de cliver des facteurs de virulence des *Enterobacteriaceae* comme *Salmonella enterica*, *S. flexneri* et *Yersinia enterocolitica* (Weinrauch *et al.*, 2002). Cette spécificité de l'HNE est due à différents résidus proches du site actif (Averhoff *et al.*, 2008). En 1999, MacIvor *et al.* ont montré que les neutrophiles de souris CatG^{-/-} présentent des morphologies et des propriétés anti-microbiennes identiques aux neutrophiles de souris sauvages. Les souris CatG^{-/-} sont aussi résistantes aux infections à *E. coli*, *S. aureus* et *K. pneumoniae* que les souris sauvages (MacIvor *et al.*, 1999). En 2000, une étude similaire à la précédente a montré que l'HNE et la CatG sont essentielles pour l'activité antifongique et bactéricide des neutrophiles vis-à-vis de *C. albicans*, *A. fumigatus* et *S. aureus* (Tkalcovic *et al.*, 2000). L'activation de ces NSPs dans les phagolysosomes est associée à une augmentation de pH due à un influx de K⁺. L'augmentation de la force ionique va permettre la libération des NSPs des protéoglycanes sulfatés membranaires comme les serglycines (Reeves *et al.*, 2002). A ce jour, aucune cible protéique bactérienne n'a été décrite pour la CatG et la Pr3. De plus, il semblerait que l'activité anti-microbienne de la CatG serait due à 3 peptides issus de la protéolyse de cette dernière (Shafer *et al.*, 1991 ; Miyasaki *et al.*, 1995). De même l'activité enzymatique de la Pr3, qui possède une structure proche de l'azurocidine, ne semble pas être impliquée directement dans l'activité anti-microbienne. Mais, la Pr3 est capable de libérer la seule cathélicidine humaine la LL37, un puissant agent antimicrobien, à partir de son précurseur inactif l'hCAP18 (Sorensen *et al.*, 2001).

Plus récemment, un nouveau mécanisme antimicrobien a été décrit. Les NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*) sont des filaments d'ADN relargués par les neutrophiles activés. Les NETs sont capables de capturer et de tuer différents pathogènes (bactéries et champignons). Dans ces filaments d'ADN, on retrouve l'HNE et la CatG qui sont capables de dégrader des facteurs de virulence (Brinkmann *et al.* 2004). Des études montrent, à l'inverse, que ces trois protéases peuvent également atténuer les mécanismes de défense et faciliter les infections virales. Les NSPs sont capables d'inactiver des molécules de la défense immunitaire innée comme la protéine de surfactant D (Hirche *et al.*, 2004b). L'HNE, la CatG

et leurs orthologues murines sont capables de cliver la flagelline, un facteur de virulence de nombreuses bactéries, inactivant ainsi son activité pro-inflammatoire et limitant la réponse immunitaire des cellules épithéliales induite par ce PAMP (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) (Lopez-Boado *et al.*, 2004). L'élimination de *P. aeruginosa*, lors d'une infection pulmonaire, est plus efficace chez les souris déficientes en CatG (Sedor *et al.*, 2007). L'HNE facilite l'infection des cellules U937 par les réovirus (Golden et Schiff, 2005) et la CatG augmente la sensibilité des macrophages au virus HIV-1 (Moriuchi *et al.*, 2000). La libération de ces protéases pour éliminer les microorganismes va pouvoir être à l'origine d'exacerbations de la réponse inflammatoire en favorisant la prolifération virale. De telles réactions d'exacerbations peuvent avoir lieu chez les patients atteints de BPCO.

Il est tout de même à noter que les conclusions concernant l'activité anti-microbienne des NSPs ont été déterminées à partir de modèles de souris déficientes. Or, les neutrophiles murins ne possèdent pas le même arsenal antimicrobien que les neutrophiles humains.

B. La modulation des chimiokines et des cytokines

Lors de la réaction inflammatoire, les NSPs vont être libérées en même temps que des cytokines et des chimiokines. Ces trois protéases peuvent influencer la biodisponibilité de ces médiateurs de la communication intercellulaire.

1. La modulation des chimiokines

Le clivage d'un fragment N-terminal de l'IL-8 (CXCL8) et de l'ENA-78 (CXCL5) par la Pr3 et la CatG, respectivement, améliore les propriétés chimiotactiques de ces molécules clivées pour les neutrophiles, par rapport aux molécules non clivées (Padrines *et al.*, 1994 ; Nufer *et al.*, 1999). La CatG est capable de cliver la CCL15 (MIP-1δ) dans sa partie N-terminale augmentant ainsi son activité chimiotactique pour les monocytes (Richter *et al.*, 2005). La protéine CTAP-III (*Connective Tissue-Activating Peptide-III*) est activée en NAP-2 (*Neutrophil-Activating Peptide-2* ou CXCL7) par la CatG (Schiemann *et al.*, 2006). La CatG et l'HNE activent la prochemerine en chemerine, qui est un chimioattractant pour les monocytes, les cellules dendritiques et les NK, en clivant un peptide en C-terminal (Wittamer *et al.*, 2005). En revanche, la Pr3 est capable d'inactiver la prochemerine. Elle clive la prochemerine, libérant une « chemerine-like » tronquée de ses huit derniers acides aminés en C-terminal, qui n'active pas son récepteur, le ChemR23 (Guillabert *et al.*, 2008). L'HNE et la CatG activent également une forme alternative de la chimiokine CCL23. Un clivage en N-

terminal entraîne la libération d'une chimiokine pouvant se fixer sur son récepteur classique, le CCR1 et sur un récepteur de l'immunité de type FPR, le FPRL1 (CCR12), avec une forte affinité. Cette chimiokine peut jouer des rôles importants dans la régulation de l'inflammation et serait un lien entre l'immunité innée et adaptative (Miao *et al.*, 2007).

La CatG diminue l'activité chimiotactique de la CCL5 (RANTES) en clivant 3 résidus dans la partie N-terminale (Lim *et al.*, 2006). Les trois protéases sont capables d'inactiver les propriétés chimiotactiques de MIP-1 α (CCL3) (Ryu *et al.*, 2005). Les NSPs peuvent cibler les molécules solubles mais aussi leurs récepteurs. Ainsi, l'HNE et la CatG inactivent les propriétés chimioattractantes de SDF-1 α (CXCL12) soit en clivant la chimiokine soit en clivant son récepteur, le CXCR4 (Delgado *et al.*, 2001 ; Valenzuela-Fernandez *et al.*, 2002). Les neutrophiles libèrent également des chimiokines. La libération de MIP-2 (CXCL2) est dépendante de l'activité de la CatG (Raptis *et al.*, 2005).

2. La modulation des cytokines

L'IL-18 est synthétisée par différentes cellules sous forme d'un précurseur inactif, la pro-IL-18. La caspase 1 active cette cytokine. Les cellules épithéliales stimulées avec du LPS et en présence de Pr3 libèrent de l'IL-18, indépendamment de l'activité caspase 1 (Sugawara *et al.*, 2001). En revanche, l'HNE diminue l'activité biologique de cette cytokine (Robertson *et al.*, 2006). Le TNF- α et l'IL-1- β sont synthétisés sous forme de précurseurs membranaires. La caspase 1 active ces deux cytokines. Il a été montré que la Pr3 était également capable d'activer les deux précurseurs (Coeshott *et al.*, 1999 ; Armstrong *et al.*, 2006). En ce qui concerne l'HNE et la CatG, les données sont controversées. En 1991, Scuderi *et al.* ont montré que ces deux enzymes inactivaient le TNF- α alors que Mezyk-Kopec *et al.* ont montré qu'elles libéraient du TNF- α actif à partir du précurseur membranaire (Scuderi *et al.*, 1991 ; Mezyk-Kopec *et al.*, 2005). L'IL-32 est synthétisée par les cellules NK et les LT. Cette cytokine est surexprimée lors de pathologies inflammatoires comme la maladie de Crohn et les BPCO (Dinareello et Kim, 2006). La Pr3 peut cliver cette cytokine et améliorer son activité biologique (Novick *et al.*, 2006). Enfin, les trois protéases sont capables de dégrader et d'inactiver l'IL-6, une cytokine surexprimée en conditions inflammatoires (Bank *et al.*, 2000). Cette cytokine possède à la fois des effets anti- et pro-inflammatoires (Kamimura *et al.*, 2006).

Le contrôle de la biodisponibilité, à savoir la libération, l'activation et/ou l'inactivation des chimiokines et des cytokines, place les NSPs au centre de la régulation de la réaction inflammatoire.

C. La régulation des facteurs de croissance

Deux facteurs de croissance vont être principalement régulés par les NSPs : le TGF- α et le TGF- β .

Le TGF- α est synthétisé sous la forme d'une pro-forme membranaire. Il va pouvoir être libéré après clivage protéolytique par la TACE (*Tumor-necrosis factor Activating-Converting Enzyme*), une métalloprotéase membranaire, activée par les ROS. L'HNE peut également libérer le TGF- α (Meyer-Hoffert *et al.*, 2004). Le TGF- α soluble va induire la production de mucine, en particulier MUC5AC ainsi que l'hyperplasie des cellules de la muqueuse pulmonaire en se fixant sur son récepteur, l'EGFR (*Epithelial Growth Factor Receptor*) (Kohri *et al.*, 2002 ; Voynow *et al.*, 2004). Il a été montré que l'HNE pouvait également être impliquée dans l'activation de l'EGFR de façon indirecte, en activant la protéine kinase C, la production de ROS et ainsi l'activation de la TACE (Shao et Nadel, 2005). L'activation de l'EGFR est la cause principale de la surproduction de mucus dans les pathologies inflammatoires pulmonaires comme les BPCO (Nadel, 2007) et de la prolifération des kératinocytes dans le psoriasis (pathologie inflammatoire de la peau) (Meyer-Hoffert *et al.*, 2004).

Le TGF- β existe sous une forme latente, complexé avec deux autres protéines : la LAP (*Latency-Associated Protein*) et la LTBP (*Latent TGF-beta-Binding Protein*). Cette dernière permet l'association du TGF- β aux protéines de la matrice extracellulaire. L'HNE est capable de réguler la libération du TGF- β de deux façons : en clivant la LTBP ou en activant sa libération par les cellules des muscles lisses via la voie MyD88 (*Myeloid Differentiation primary-response gene 88*)/IRAK (*IL-1 Receptor-Associated Kinase*)/NF- κ B (Taipale *et al.*, 1995 ; Lee *et al.*, 2006). Le TGF- β possède des activités pro-fibrosantes et active la sécrétion de mucus. En 2004, une étude a montré que l'instillation intra-trachéale d'HNE chez la souris entraînait l'augmentation croissante de TGF- β dans les LLBA (Buczek-Thomas *et al.*, 2004), impliquant ainsi l'HNE dans les processus de destruction (emphysème) et d'accumulation (fibrose) de la matrice extracellulaire (Chua et Laurent, 2006 ; Chua *et al.*, 2007).

D. La modulation des récepteurs cellulaires

Les NSPs peuvent contribuer à la réaction inflammatoire en dégradant des récepteurs cellulaires. Parmi ces récepteurs, on retrouve les intégrines et les PARs (*Protease-Activated Receptor*). Les intégrines vont assurer la connexion entre les cellules à leur environnement.

Les PARs sont des récepteurs de la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Ils régulent de nombreuses fonctions cellulaires comme l'inflammation et la défense immunitaire. Les PARs sont activés par protéolyse de la partie exposée au solvant. La protéolyse de la partie exposée du récepteur va libérer un ligand qui va entraîner l'auto-activation du récepteur (Shpacovitch *et al.*, 2007).

L'HNE est capable de cliver les 19 derniers résidus de la chaîne lourde de la sous unité alphaIIb de l'intégrine alphaIIbbeta3, ce qui conduit à l'activation plaquettaire (Si-Tahar *et al.*, 1997). Il a été récemment montré que l'activité de la CatG à la surface des neutrophiles leur permettait un meilleur déplacement. Ce processus ne fait pas intervenir le clivage direct d'une intégrine mais nécessite l'activité enzymatique de la CatG (Raptis *et al.*, 2005). En 1993, Nathan *et al.* ont montré que le clivage de la leukosialine (CD43 ou sialophorine) est nécessaire pour le déplacement et l'activation des neutrophiles en réponse à différents stimuli (Nathan *et al.*, 1993). L'HNE est capable de cliver l'ectodomaine du CD43 (Remold-O'Donnell et Parent, 1995). Une étude récente a montré que la CatG est capable de libérer différents fragments du domaine extracellulaire du CD43. Ces fragments solubles du CD43 inhibent les interactions entre les neutrophiles et les sélectines E des cellules endothéliales (Mambole *et al.*, 2008).

L'HNE est capable de se lier aux intégrines comme au CD11b/CD18 (Cai et Wright, 1996) et la Pr3 est co-précipitée avec l'intégrine CD11b et le récepteur FcγRIIIb (David *et al.*, 2003 ; David *et al.*, 2005). Une étude récente a montré que l'HNE et la CatG membranaires sont liées par des protéoglycanes sulfatés : chondroïtines et héparanes sulfates (Campbell et Owen, 2007). En 2006, il a été montré que la Pr3 se retrouvait dans des complexes de haute masse moléculaire avec le récepteur FcγRIIIb et le CD11b/CD18 (Fridlich *et al.*, 2006).

Les PARs jouent un rôle important dans la réaction inflammatoire. La CatG active directement le PAR4 sur les plaquettes. L'activation de ce récepteur peut être à l'origine des interactions entre les neutrophiles et les plaquettes au site de l'inflammation (Sambrano *et al.*, 2000). Le rôle des protéases à sérine de neutrophiles sur l'activation des autres PAR est moins clair. En effet, PAR2 peut être activé et inactivé par ces protéases (Shpacovitch *et al.*, 2007). Uehara *et al.* ont montré *in vitro* que le PAR2, à la surface de cellules épithéliales buccales, peut être activé par la Pr3 (Uehara *et al.*, 2002). Ils ont également montré que ces mêmes cellules épithéliales buccales, activées avec des cytokines comme l'IL-1α, le TNF- α et l'IFNγ, produisent de la Pr3. Cette Pr3 va être soit libérée dans le milieu ou liée aux membranes des cellules. Des anticorps anti-Pr3 peuvent activer ces cellules par une voie faisant intervenir le PAR2 (Uehara *et al.*, 2004). En 2003, ils ont montré que le PAR2 sur des

fibroblastes gingivaux humains peut être activé par les NSPs et entraîne la libération d'IL-8 et de CCL2 (MCP-1) (Uehara *et al.*, 2003). En revanche, Dulong *et al.* ont montré que l'HNE et la CatG pouvaient inactiver PAR2 à la surface des cellules épithéliales pulmonaires (Dulong *et al.*, 2003). Les NSPs clivent le PAR1 en différents sites sur les cellules endothéliales et les plaquettes. Le PAR1 est le récepteur spécifique de la thrombine, une autre protéase à sérine impliquée dans la coagulation. Une fois clivé par les trois protéases à sérine, le PAR1 ne peut plus être activé par la thrombine (Renesto *et al.*, 1997). Il est clair que les NSPs influencent la réaction inflammatoire en modulant l'activité de ces récepteurs.

Différentes expériences ont montré que la CatG possède des activités chimioattractantes pour les monocytes et que cette activité est dépendante de son activité enzymatique (Chertov *et al.*, 1997). De plus, l'effet chimioattractant de la CatG peut être inhibé par le fMLP, ce qui suggère que ces deux molécules ont le même récepteur. Sun *et al.* ont montré que la CatG se fixe sur le FPR, récepteur de haute affinité du fMLP. La fixation à ce récepteur de la CatG et du fMLP ne va pas entraîner la même cascade de signalisation intracellulaire. En effet, la CatG ne va que très peu activer les flux calciques et la voie des MAPK. En revanche, elle va induire la translocation à la membrane de la PKC ξ , nécessaire pour l'activité chimioattractante de la CatG (Sun *et al.*, 2004a). L'HNE induit la synthèse de l'IL-8 (Devaney *et al.*, 2003) ainsi que de la cathepsine B et la MMP-2 (Geraghty *et al.*, 2007a), ce qui confère un rôle important à l'HNE dans la hiérarchisation de la réponse inflammatoire. La voie d'activation passe par le MyD88/IRAK/TRAF-6 (*TNF-Receptor-Associated Factor-6*) et fait également intervenir le TLR4. En bloquant ce dernier, on inhibe la synthèse d'IL-8, de MMP-2 et de cathepsine B. De plus, l'activité anti-parasitaire des macrophages contre *Leishmania major* requiert l'association de l'activité enzymatique de l'élastase et le TLR4 (Ribeiro-Gomes *et al.*, 2007). A ce jour, on ne connaît pas le mécanisme d'activation du TLR4 par l'HNE.

E. L'inactivation des récepteurs de surface

Les récepteurs de surface peuvent également être inactivés, les rendant ainsi moins sensibles aux cytokines libérées dans le milieu.

L'activation des neutrophiles par des agents pharmacologiques comme les ionophores calciques ou par des peptides chimioattractants comme le fMLP et le C5a, entraîne une diminution des récepteurs de surface au TNF- α . L'HNE est responsable de la dégradation du récepteur p75 du TNF- α , libérant une forme soluble de 32 kDa alors que l'autre récepteur du

TNF- α , le récepteur de 55 kDa, est totalement résistant à la protéolyse (Porteu *et al.*, 1991). L'HNE peut ainsi jouer le rôle de régulateur de la réponse au TNF- α lors de la réaction inflammatoire. Le récepteur à l'urokinase, l'uPAR (CD87) peut être clivé par l'HNE et la CatG, limitant ainsi la fixation de l'uPA et donc la protéolyse cellulaire lors du remodelage tissulaire. De plus, des fragments issus de l'hydrolyse de ce récepteur possèdent des propriétés chimiotactiques pour les monocytes (Beaufort *et al.*, 2004a, b). Le CD14, principal récepteur cellulaire de surface du LPS chez les monocytes est clivé par l'HNE et la CatG (Le Barillec *et al.*, 1999 ; Le Barillec *et al.*, 2000). Le clivage de ce récepteur entraîne une diminution de la synthèse de TNF- α et d'IL-8 en réponse au LPS et donc une diminution de la réponse inflammatoire. Les protéases exerceraient alors un contrôle négatif sur la réaction inflammatoire. Mais le clivage de ce même récepteur limite la reconnaissance et donc la phagocytose des cellules apoptotiques par les macrophages. L'élafine, un inhibiteur endogène de l'HNE, protège le CD14 de la protéolyse (Henriksen *et al.*, 2004a). En 2002, Vandivier *et al.* ont montré que chez patients atteints de mucoviscidose, l'HNE retarde l'élimination des cellules apoptotiques en dégradant spécifiquement le récepteur aux phosphatidylsérines (Vandivier *et al.*, 2002). Dans ce cas, l'HNE possède un effet pro-inflammatoire en retardant la résolution de l'inflammation qui s'effectue normalement par l'élimination efficace des cellules apoptotiques par les phagocytes. Les neutrophiles et le système du complément sont des composants importants de la réponse immunitaire innée. Leurs interactions orientent la réaction inflammatoire. En 1991, Maison *et al.* ont montré que la CatG pouvait cliver le fragment C3 en deux fragments actifs. Le C3a-like est un chimioattractant puissant et le C3b-like est une opsonine (Maison *et al.*, 1991). Le C5 peut également être clivé par l'HNE libérant un peptide C5a-like mais aussi un C5b-like qui peut s'associer au fragment C6 et permettre la lyse des globules. Le C5a-like, comme le C5a, possède des propriétés chimiotactiques (Vogt, 2000). Il a été montré que l'HNE et la CatG, mais pas la Pr3, sont capables d'inhiber la chimiotaxie des neutrophiles en réponse au C5a mais pas en réponse au PAF, au LTB4 et à l'IL-8 (Tralau *et al.*, 2004). Cette activité permettrait de réguler la réponse des neutrophiles lors d'une réponse inflammatoire aiguë. Le récepteur du complément CR1 (CD35 ou récepteur C3b/C4b) est clivé par l'HNE, libérant ainsi un fragment soluble appelé sCR1 qui inhibe la cascade d'activation du complément. L'HNE agit ici comme un rétro-contrôle négatif à la réaction inflammatoire (Sadallah *et al.*, 1999). Une étude récente a montré que le CXCR1, un des deux récepteurs à l'IL-8, joue un rôle important dans la physiopathologie de la mucoviscidose. En effet, l'activité anti-bactérienne de l'IL-8 est médiée par ce récepteur. Le recrutement massif de neutrophiles, la libération excessive

d'HNE et la diminution de la concentration des inhibiteurs vont favoriser le clivage du CXCR1 par cette protéase. La libération de fragments glycosylés issus de cette protéolyse entraîne l'activation des cellules épithéliales bronchiques via l'activation du TLR2 et la production d'IL-8 qui va maintenir le recrutement des neutrophiles et l'état inflammatoire (Hartl *et al.*, 2007). Les NSPs sont capables de dégrader l'IL-6 et leur récepteur membranaire, modulant ainsi ces effets pro- et anti-inflammatoires (Bank *et al.*, 2000). Le CD23, récepteur de faible affinité pour les IgE, à la surface des LB, peut être clivé par l'HNE et la CatG. Les fragments libérés possèdent des activités pro-inflammatoires pour les monocytes humains. Ils vont induire la synthèse de ROS et de cytokines comme le TNF- α (Brignone *et al.*, 2001). Les NSPs peuvent donc activer et inactiver les récepteurs cellulaires membranaires, modulant ainsi la réponse inflammatoire.

F. L'adhésion et la migration cellulaire

L'adhésion forte à l'endothélium et la migration au travers des cellules endothéliales sont deux étapes importantes du recrutement des neutrophiles au site de l'inflammation. Les résultats obtenus avec l'utilisation d'inhibiteurs de protéases et/ou des souris KO pour les protéases ne sont pas très clairs quant à l'implication des NSPs dans la migration cellulaire. Il a été montré que l'inhibition de l'HNE et de la CatG par la serpine LEX-032 (dérivée de l'alpha1-antichymotrypsine) diminuait l'adhésion des neutrophiles sur des cellules endothéliales (Delyani *et al.*, 1996) bien que l'utilisation de différents inhibiteurs des NSPs n'influence pas la migration transendothéliale *in vitro* (Mackarel *et al.*, 1999). Les neutrophiles murins déficients en CatG et en élastase sont recrutés comme les neutrophiles sauvages aux sites de l'inflammation (MacIvor *et al.*, 1999 ; Hirche *et al.*, 2005a). Young *et al.* ont montré que la mNE joue un rôle dans l'adhésion et la migration des neutrophiles activés par du zymosan et par le LTB₄, même s'il existe des mécanismes compensatoires (Young *et al.*, 2004 ; Young *et al.*, 2007). De même, Wang *et al.* ont montré qu'en bloquant la mNE et les intégrines alpha VI, la migration transendothéliale des neutrophiles est diminuée (Wang *et al.*, 2005). L'HNE et la CatG sont capables de cliver les protéines de jonctions intercellulaires comme les cadhérines E, les ICAM-1 et les VCAM-1 (Hermant *et al.*, 2003 ; Robledo *et al.*, 2003). Bien que les NSPs soient capables de passer entre les cellules endothéliales en dégradant les jonctions intercellulaires, leur rôle dans la migration cellulaire reste à ce jour encore controversé.

G. L'apoptose

Les granzymes contenus dans les LT cytotoxiques, sont connus pour leurs activités pro-apoptotiques. Les NSPs peuvent également avoir une activité pro-apoptotique, en particulier la Pr3 (Korkmaz *et al.*, 2007). L'HNE et la Pr3 sont capables de pénétrer dans les cellules endothéliales et de provoquer une cascade de signaux pro-apoptotiques via ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*), JNK (*Jun N-terminal Kinase*) et p38 MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) (Preston *et al.*, 2002). L'inhibition de JNK bloque l'activité pro-apoptotique de la Pr3 alors que l'inhibition de p38 MAPK bloque celle des deux NSPs, ce qui montre que ces enzymes contrôlent la viabilité cellulaire. L'HNE et la Pr3 peuvent cliver le NF- κ B mais avec des sites de clivage différents : HNE dans le C-terminal et la Pr3 dans le N-terminal de la sous-unité p65 du NF- κ B (Preston *et al.*, 2002). De plus, la Pr3 clive spécifiquement la protéine p21 (Waf1/Cip1/Sdi1) pour induire l'apoptose dans les cellules endothéliales (Pendergraft *et al.*, 2004). L'HNE peut aussi induire l'apoptose de cellules épithéliales en altérant la perméabilité de la membrane mitochondriale (Ginzberg *et al.*, 2004). Ces propriétés pro-apoptotiques impliquent les NSPs dans la survie des cellules épithéliales et endothéliales lors de la réaction inflammatoire.

H. L'activation des cellules de l'immunité

La connexion entre les cellules de l'immunité est très importante. Les cytokines et les chimiokines, libérées par ces cellules, sont les principaux médiateurs de cette synergie. Les NSPs peuvent également avoir un rôle dans l'activation des cellules de l'immunité.

Il a été montré que la CatG pouvait activer les lymphocytes B et moduler la réponse humorale chez la souris (Hase-Yamazaki et Aoki, 1995). La production d'anticorps est améliorée quand un antigène est administré avec de la CatG. Après une seconde stimulation, la production d'IFN- γ et d'IL-4 par les lymphocytes est plus importante pour les souris immunisées avec l'antigène en présence de CatG par rapport aux souris immunisées avec l'antigène seul (Tani *et al.*, 2001). Cette protéase aurait un rôle d'adjuvant. En 2007, Maffia *et al.*, ont montré que l'HNE est capable de transformer les cellules dendritiques immatures en cellules sécrétrices de TGF- β ce qui diminue le pouvoir de stimulation de ces cellules vis-à-vis des lymphocytes T (Maffia *et al.*, 2007). Une étude récente a montré que les trois NSPs, en particulier l'HNE, sont capables d'activer la production, par les éosinophiles, de ROS et de cytokines pro-inflammatoires à forte activité chimiotactique pour les neutrophiles comme

l'IL-6, l'IL-8, le TNF- α et le GRO- α . Cette synergie peut être à l'origine de réactions d'exacerbations neutrophiliques chez les patients atteints d'asthme sévère (Hiragushi *et al.*, 2008).

I. L'activation des protéases et l'inactivation des inhibiteurs

Les NSPs vont être également capables d'activer les proformes des protéases (zymogènes), en particulier les MMPs et les protéases à cystéine, et d'inactiver leurs inhibiteurs respectifs.

Les NSPs activent la pro-MMP-2 (gélatinase A) membranaire. Cette activation requiert la MT-MMP1. L'activation de cette protéase confère aux NSPs un rôle dans l'environnement inflammatoire lors de l'invasion tumorale et de l'angiogénèse (Shamamian *et al.*, 2001). Lorsque la pro-MMP-2 est soluble, seule la Pr3 est capable de l'activer. L'HNE active la pro-MMP-9 (Ferry *et al.*, 1997), inactive le TIMP1 lorsqu'il est associé à la pro-MMP-9 (Itoh et Nagase, 1995) et la MMP-9 inactive à son tour l' α 1-PI (Liu *et al.*, 2000a, b). Dans les LLBA de patients atteints de mucoviscidose, les activités enzymatiques des MMP-9 et de l'HNE sont élevées alors que la concentration en TIMP-1 est fortement diminuée (Gaggar *et al.*, 2007). L'HNE et la CatG activent la pro-MMP-1 (Saunders *et al.*, 2005). La Pr3 inactive le TFPI (*Tissue Factor Pathway Inhibitor*), un inhibiteur impliqué dans le processus de coagulation sanguine (Hamuro *et al.*, 2007). Il a été récemment montré que l'HNE induit la production de MMP-2 et de cathepsine B par les macrophages, et que cette activité peut être inhibée *in vivo* et *in vitro* par de l' α 1-PI (Geraghty *et al.*, 2007a ; Geraghty *et al.*, 2008).

L'HNE peut inactiver la cystatine C, l'inhibiteur principal des protéases à cystéine, mais elle peut également activer une des cibles de la cystatine C, la cathepsine B (Abrahamson *et al.*, 1991 ; Buttle *et al.*, 1991). L'inactivation de la cystatine C par l'HNE est à corréluer avec la dégradation des collagènes lors d'anévrisme de l'aorte abdominale (Abdul-Hussien *et al.*, 2007).

Cette régulation localisée du potentiel protéolytique confère aux NSPs un rôle important dans le remaniement de la matrice extracellulaire et la régulation de l'inflammation.

J. L'implication dans les pathologies humaines

Il existe différentes pathologies humaines liées à un défaut de fonctionnement des neutrophiles. La plupart de ces pathologies se traduisent par une insuffisance immunitaire et des sensibilités aux infections accrues qui peuvent devenir mortelles. Le système oxydatif ou les protéases à sérine peuvent être impliqués dans ces pathologies. La granulomatose chronique ou CGD (*Chronic Granulomatous Disease*) est caractérisée par une mutation dans une des sous-unités de la NADPH oxydase qui empêche les neutrophiles de former des ROS, essentiels à la destruction des microorganismes phagocytés. D'autres pathologies impliquent les 3 NSPs soit au niveau génétique comme les neutropénies, soit au niveau de la maturation des protéases et du trafic intracellulaire comme le syndrome de Chediak-Higashi et le syndrome de Papillon-Lefevre et enfin au niveau des protéines matures comme la granulomatose de Wegener ou le syndrome de Churg-Strauss. L'HNE peut également être impliquée dans des cas de leucémie comme la leucémie promyélocytaire sévère (Pham, 2008).

Les neutropénies cycliques et congénitales sévères sont des pathologies caractérisées par un arrêt de la maturation des granulocytes au stade promyélocytaire. Des mutations sur le gène *ELA2* codant pour l'HNE sont à l'origine de ces pathologies (Horwitz *et al.*, 2007). Des études récentes ont montré que les mutations dans l'HNE entraînent des problèmes de trafic intracellulaire et une accumulation de cette protéine mutée dans le cytoplasme, conduisant à l'apoptose des cellules (Kollner *et al.*, 2006).

Le syndrome de Chediak-Higashi se caractérise par des infections récurrentes, des problèmes de coagulation et un albinisme partiel. Une mutation sur le gène humain *CHS1* (*Chediak-Higashi Syndrome 1*) et son orthologue murin, le gène codant la protéine Lyst (*Lysosomal Trafficking regulator*), est à l'origine de ce syndrome (Ward *et al.*, 2000 ; Holt *et al.*, 2006)). Les neutrophiles et les lymphocytes de patients (ou de souris dites « beige ») qui ont cette mutation, forment de gros granules intracytoplasmiques avec des défauts importants pour l'exocytose et une activité des NSPs réduite, ce qui explique les sensibilités aux infections. La perte de fonction d'une protéase à cystéine, la DPPI qui est l'enzyme de maturation des protéases à sérine a été identifiée chez les patients atteints du syndrome de Papillon-Lefevre (Hart *et al.*, 2000 ; Toomes *et al.*, 1999). Les neutrophiles de ces patients n'ont qu'une très faible activité des NSPs (de Haar *et al.*, 2004 ; Pham *et al.*, 2004). La perte

de l'activité Pr3 entraîne une non maturation de l'hCAP18 en LL-37, un puissant agent antimicrobien (Sorensen *et al.*, 2001) ce qui peut expliquer la sensibilité des patients atteints du syndrome de Papillon-Lefevre aux infections comme les maladies du parodonte (parodontites et gingivites, maladies à bactéries à Gram négatif) (de Haar *et al.*, 2006). Il est tout de même à noter que tous les patients atteints du syndrome de Papillon-Lefevre n'ont pas de déficience immunitaire, ce qui montre que les neutrophiles possèdent un arsenal antibactérien autre que les NSPs (Pham *et al.*, 2004).

La Pr3 est à l'origine de la formation d'auto-anticorps appelés ANCA (*AntiNeutrophil Cytoplasmic Antibodies*) qui sont retrouvés lors de vasculites des petits vaisseaux comme la granulomatose de Wegener ou le syndrome de Churg-Strauss. Les ANCA sont des anticorps dirigés contre deux protéines des granules azurophiles des neutrophiles : la Pr3 et la MPO (Bosch *et al.*, 2006 ; Kallenberg *et al.*, 2006). Il est à noter que les neutrophiles apoptotiques expriment à leur surface de la Pr3 mais pas d'HNE (Durant *et al.*, 2004). Les ANCA activent les neutrophiles. Ils vont libérer des ROS et des cytokines pro-inflammatoires *in vitro*. *In vivo*, les ANCA anti-MPO induisent des vascularites et des glomérulonéphrites pauci-immune nécrosantes chez les souris (Xiao *et al.*, 2002).

Les patients atteints de leucémie promyélocytaire sévère présentent une transposition chromosomique qui fusionne le gène *PML* et le gène *RAR* qui code pour le récepteur α de l'acide rétinoïque (Retinoic-Acid-Receptor- α). Cette protéine de fusion PML-RAR α est impliquée dans la transformation leucocytaire. L'HNE clive cette protéine de fusion dans le noyau à différents endroits. Les souris déficientes en élastase ne développent pas de leucémie promyélocytaire sévère (Lane et Ley, 2003). Une étude récente a montré que l'HNE est également impliquée dans une autre lignée de cellules myéloïdes leucémiques (Goulet *et al.*, 2008).

Les NSPs peuvent également être impliquées dans des processus inflammatoires non infectieux comme dans certains cancers. Le remaniement direct de la matrice extracellulaire et l'activation des MMPs favorisent l'invasion des cellules tumorales dans les tissus sains. En effet, l'HNE va être exprimée de façon anormale dans des cellules de cancer du sein (Desmedt *et al.*, 2006) et peut être à l'origine de la dispersion des cellules cancéreuses pulmonaires (Wislez *et al.*, 2007), de l'invasion et du pouvoir métastatique des tumeurs (Sun et Yang, 2004 ; Sato *et al.*, 2006). La CatG est impliquée dans différentes pathologies

cardiaques (Jahanyar *et al.*, 2007 ; Rafiq *et al.*, 2008). Il a été également montré que les NSPs pouvaient être impliquées dans des pathologies comme la pemphigoïde bulleuse (*Bullous Pemphigoid*), une maladie auto-immune de la peau (Liu *et al.*, 2000) et l'arthrite (Adkison *et al.*, 2002).

Chapitre IV : La régulation de l'activité protéolytique des protéases à sérine de neutrophiles.

I. Les inhibiteurs

A. L'alpha 2 Macroglobuline

L'alpha 2 Macroglobuline ($\alpha 2M$) est un inhibiteur plasmatique, essentiellement produit et sécrété par le foie, présent à une concentration de 2 g/L dans le sérum. L' $\alpha 2M$ est une glycoprotéine de haute masse moléculaire qui se présente sous la forme d'un homotétramère de 720 kDa, formée par l'assemblage de deux paires de sous-unités identiques de 180 kDa chacune reliées entre elles par des ponts disulfure. Chaque sous-unité possède une région appât (« bait region ») composée d'environ 25 acides aminés. Cette région, très sensible à la protéolyse, est exposée sous forme d'une boucle à la surface de l'inhibiteur. Cet inhibiteur ne possède pas de spécificité d'inhibition, il peut se complexer de la même façon avec les quatre grandes classes de protéases dont les NSPs (Tableau V).

Inhibiteurs	HNE	Pr3	CatG	PPE	Trypsine	Chymo.	Chymase	Plasmine	Thrombine
$\alpha 2M$	$4,1.10^7^a$	$1,1.10^7^b$	$3,7.10^6^a$	I ^d	I ^d	I ^d		I ^d	I ^d
$\alpha 1-PI$	$6,5.10^7^c$	$8,1.10^6^b$	$4,1.10^5^c$	1.10^5^c	$1,3.10^5^c$	$5,4.10^6^c$		$1,9.10^2^c$	$4,8.10^1^c$
ACT	AI	AI	$5,1.10^7^c$			1.10^4^c	$2,1.10^4^e$		
MNEI	$3,4.10^7^f$	$1,7.10^7^f$	$2,3.10^8^f$	$1,9.10^7^f$		$2,8.10^6^f$	$2,2.10^5^f$		
PI6	$1,5.10^5^j$		$6,8.10^8^g$		I ^d	6.10^6^h			I ^d
PI9	$1,5.10^5^i$								
SCCA2		I ^k	1.10^5^k				3.10^4^k		

Tableau V : Valeurs des constantes de vitesse d'association ($M^{-1}.s^{-1}$) de l' $\alpha 2M$ et des autres serpins avec les protéases à sérine. (D'après ^a Virca et Travis, 1984 ; ^b Rao *et al.*, 1991 ; ^c Beatty *et al.*, 1980 ; ^d Barrett et Starkey, 1973 ; ^e Schechter *et al.*, 1989 ; ^f Cooley *et al.*, 2001 ; ^g Scott *et al.*, 1999 ; ^h Riewald et Schleef, 1996 ; ⁱ Dahlen *et al.*, 1999 ; ^j Zhang *et al.*, 2007 ; ^k Schick *et al.*, 1997). AI : Aucune Inhibition ; I : Inhibition mais valeur de k_{ass} non déterminée. Chymo. : Chymotrypsine.

Lorsqu'une protéase interagit avec l' $\alpha 2M$, elle va cliver une des liaisons peptidiques de la région appât. Ce clivage va engendrer la rupture d'une liaison thioester interne, présente

dans une seconde boucle de l'inhibiteur, responsable d'un changement conformationnel important de l' $\alpha 2M$. La protéase va alors se trouver piégée à l'intérieur de l'inhibiteur suite à la formation de liaisons covalentes entre l'inhibiteur et la protéase. Ces liaisons impliquent principalement des chaînes latérales de Lys ($\epsilon\text{-NH}_2$) de la protéase et des chaînes latérales de Glu ($\gamma\text{-COOH}$) issues de la liaison thioester clivée de l'inhibiteur. La protéase dont le site actif reste fonctionnel n'est cependant plus capable de cliver des substrats volumineux mais peut néanmoins hydrolyser des substrats synthétiques de petites tailles qui peuvent encore accéder au site actif (Figure 17) (Sottrup-Jensen, 1989 ; Moreau, 1999).

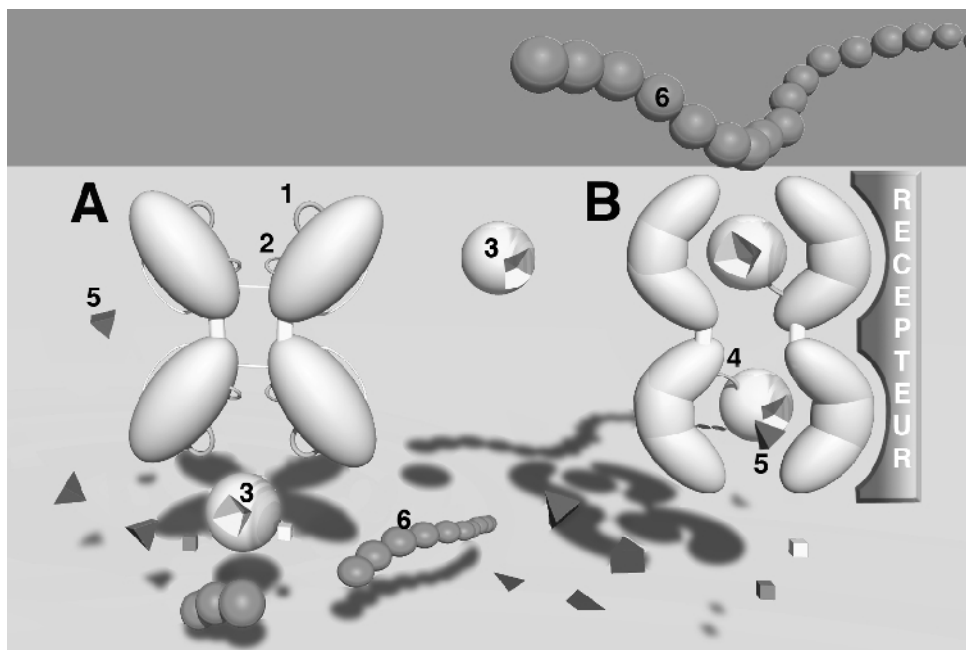


Figure 17 : Mécanisme d'inhibition des protéases par l' $\alpha 2M$. (A) $\alpha 2M$ natif formé de deux paires de sous-unités identiques. (B) $\alpha 2M$ transformé après le changement conformationnel ayant permis de piéger la protéase et exposant une région reconnue par un récepteur cellulaire. Chaque sous-unité de l' $\alpha 2M$ natif expose une région appât (1) et une boucle comportant une liaison interne (2). Le clivage de la région appât par la protéase (3) entraîne un changement conformationnel, avec parallèlement la formation d'une liaison covalente (4) engageant une Lys de la protéase et un Glu de l'inhibiteur issu de la liaison thioester clivée. Le site actif de la protéase reste cependant accessible à de petits substrats (5) mais pas à de gros substrats (6). D'après Moreau, 1999.

Le changement de conformation entraîne également l'apparition d'un domaine de liaison à un récepteur cellulaire qui permet une élimination très rapide des complexes $\alpha 2M$ /protéases. Certaines protéases sont résistantes à cet inhibiteur universel. En effet, lorsque les protéases sont sécrétées sous forme de zymogènes inactifs, elles ne vont pas être piégées. Les protéases trop volumineuses et les protéases ayant une spécificité de substrat très particulière ne vont pas être capables de cliver cette région appât.

De par son très large spectre d'inhibition de protéases endogènes mais aussi exogènes, l' α 2M peut être considéré comme un élément à part entière de la défense immunitaire innée. De plus, l' α 2M est également capable d'interagir avec différentes protéines notamment des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8 dans les poumons de patients atteints de SDRA (Kurdowska *et al.*, 1995). Ces complexes α 2M/IL-8 peuvent se lier aux récepteurs de l' α 2M présents à la surface des macrophages alvéolaires avant d'être internalisés (Kurdowska *et al.*, 2000). Un tel mécanisme permet à l' α 2M de jouer un rôle important dans la régulation de la réaction inflammatoire en épurant le milieu en protéases et en cytokines pro-inflammatoires.

B. Les serpins

La superfamille des serpins (*Serine Proteinase Inhibitor*) est constituée d'inhibiteurs irréversibles des protéases à sérine ou cystéine qui regroupe environ 1000 protéines monomériques que l'on trouve à la fois dans le règne animal, végétal et chez les virus (Potempa *et al.*, 1994 ; Silverman *et al.*, 2001), réparties en 16 clans (MEROPS the Peptidase Database, <http://merops.sanger.ac.uk/>). Les serpins des clans A à I sont celles que l'on retrouve chez les grands mammifères. Elles ont été réparties selon leurs fonctions et non selon les espèces. La superfamille des serpins est caractérisée par une structure tertiaire conservée : 9 hélices α (A à I) et 3 feuillets β (A à C) de 370-390 acides aminés (Mangan *et al.*, 2008). Ce sont des protéines glycosylées, constituées d'environ 500 acides aminés, dont le site actif est localisé au sein d'une boucle réactive ou RCL (*Reactive Center Loop*) exposée au solvant et flexible. Les serpins sont d'autant plus importantes qu'elles peuvent réguler l'activité des protéases à sérine dans le milieu extracellulaire lorsqu'elles sont sécrétées ou dans le cytoplasme lorsqu'elles sont intracellulaires.

Lors de l'interaction enzyme-serpine, la boucle réactive subit un clivage qui peut conduire à deux voies. La première, appelée « voie inhibitrice », correspond à la formation d'un complexe irréversible enzyme-serpine, inactivant ainsi l'enzyme et la seconde, dite « voie substrat » qui aboutit à la dissociation du complexe enzyme-serpine. Dans ce cas présent, il y a libération de l'enzyme sous forme active et de la serpine clivée inactivée. Les serpins fonctionnent comme des substrats suicides selon le mécanisme réactionnel décrit dans la figure 18.

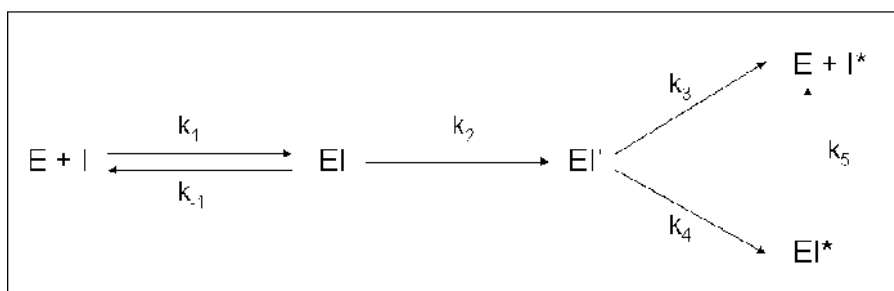


Figure 18 : Mécanisme réactionnel de l'interaction entre une serpine (I) et une protéase (E). k_1 : constante de vitesse d'association, k_{-1} : constante de vitesse de dissociation du complexe EI, k_2 : constante de formation du complexe EI' (clivage de la boucle inhibitrice), k_3 : constante de vitesse de dissociation du complexe EI' (voie substrat), k_4 : constante de vitesse de formation du complexe covalent EI* (voie inhibitrice), k_5 : constante de vitesse de dissociation du complexe EI* (D'après Silverman *et al.*, 2001).

Après la formation du complexe initial enzyme-inhibiteur (EI) (Figure 18), la boucle inhibitrice de la serpine adopterait, grâce à une grande flexibilité, une conformation complémentaire du site actif de la protéase cible. La complémentarité de la boucle inhibitrice de la serpine dans le site actif de l'enzyme est transitoire car elle va très vite être clivée au niveau du centre réactif de la boucle : la liaison P1-P'1. Ce clivage de la boucle aboutit à la formation irréversible d'un complexe EI' transitoire qui va pouvoir conduire à deux voies distinctes : une voie substrat libérant l'enzyme active et la serpine inactive clivée (I*) ou à une voie inhibitrice, avec apparition du complexe covalent enzyme-serpine (EI*), piégeant ainsi l'enzyme de façon irréversible. Il est à noter que la voie inhibitrice peut néanmoins rejoindre la voie substrat par dissociation lente du complexe EI*. Dans le complexe enzyme-serpine, la protéase est piégée suite à un changement de conformation de la boucle inhibitrice (Figure 19). En effet, lorsque la boucle réactive va être clivée, deux parties vont être libérées, la partie C-terminale et la partie N-terminale qui est liée à l'enzyme (acyl enzyme). Cette partie N-terminale, liée à l'enzyme, va venir s'insérer dans le feuillet β A, ce qui entraîne la transposition de l'enzyme à l'opposé de la boucle réactive. Durant cette étape, les structures de la protéase et celle du site actif sont perturbées. La distorsion du site actif empêche l'hydrolyse de l'acyl enzyme ce qui explique la persistance de la protéase (Figure 19) (Silverman *et al.*, 2001).

Pour un couple protéase-serpine, la contribution de chacune des deux voies (inhibitrice et substrat) est estimée en déterminant la stoechiométrie d'inhibition (SI) qui est égale à $1+r$, r étant le rapport k_3/k_4 des constantes de vitesse des deux voies ou rapport de partition. Par exemple, l'interaction entre la chymase et l'ACT a une SI de 4,5, c'est-à-dire que 3,5 molécules de serpine sont inactivées (voie substrat) et seulement une molécule de serpine se

complexe avec la protéase (voie inhibitrice). Dans ce cas, la voie substrat prédomine, ce qui fait de cette serpine un mauvais inhibiteur pour cette enzyme. Un bon inhibiteur de type serpine va avoir une SI égale à 1, comme par exemple lors de l'interaction entre l'ACT et la cathepsine G.

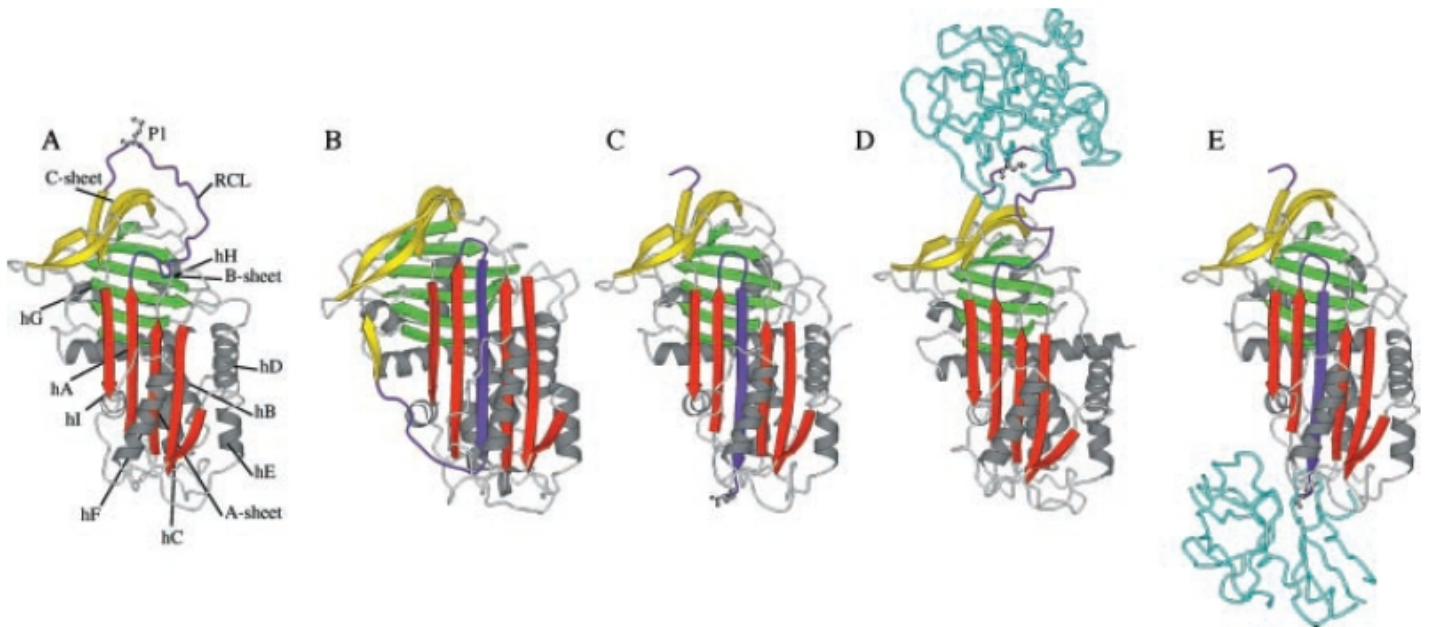


Figure 19 : Les différentes conformations des serpines. (A) forme native de l' $\alpha 1$ -PI (code PDB : 1QLP), (B) forme latente de l'antithrombine III (code PDB : 2ANT), (C) forme clivée de l' $\alpha 1$ -PI (code PDB : 7API), (D) complexe michaelien EI entre l'alsérpine de *Manduca sexta* et la trypsine (code PDB : 1I99) et (E) complexe covalent EI* entre l' $\alpha 1$ -PI et la trypsine (code PDB : 1ezx). Dans toutes les structures, le feuillet β A (A-sheet) apparaît en rouge, le feuillet β B (B-sheet) en vert et le feuillet β C (C-sheet) en jaune. Les hélices α hA à α hI sont colorées en gris. La boucle réactive (RCL) est indiquée en violet. La trypsine est colorée en bleu turquoise. Le résidu P1 de l' $\alpha 1$ -PI (selon la nomenclature de Schechter et Berger, 1967) est représenté sur la forme native de l' $\alpha 1$ -PI (A) (D'après Silverman *et al.*, 2001).

1. Les serpines extracellulaires

a. L' $\alpha 1$ -Proteinase Inhibitor ($\alpha 1$ -PI)

L' $\alpha 1$ -Proteinase Inhibitor ($\alpha 1$ -PI), également appelé $\alpha 1$ -Antitrypsin ($\alpha 1$ -AT), est un inhibiteur plasmatique essentiellement synthétisé par le foie à un taux basal de 1-2 g/L qui peut atteindre une concentration de 7 g/L lors d'une inflammation (Whicher *et al.*, 1991). C'est une glycoprotéine de 56 kDa contenant environ 12% d'oses. Son pI est compris entre 4,4 et 4,8. Il intervient dans différents processus extracellulaires comme la coagulation, la fibrinolyse, la cascade d'activation du complément et surtout l'inflammation. Il fait partie des « *Acute Phase Proteins* », protéines produites en grande quantité, en réponse à différents stimuli pro-inflammatoires, puis très rapidement libérées lors d'une réaction inflammatoire.

L' α 1-PI est l'inhibiteur préférentiel de l'HNE *in vivo* bien qu'il inhibe les deux autres protéases à sérine de neutrophiles avec des constantes de vitesse d'association plus faibles que celle obtenue avec l'HNE (Beatty *et al.*, 1980). Les résidus impliqués dans l'inhibition des protéases sont la Met358(P1) et la Ser359(P'1). Il cible d'autres protéases comme l'élastase pancréatique, la chymotrypsine, la trypsine, la thrombine, la plasmine, les kallicréines et certaines collagénases. D'après les constantes de vitesse d'association déterminées *in vitro*, l' α 1-PI semble avoir pour fonction première l'inhibition des NSPs et non de la trypsine comme cela avait été initialement suggéré (Tableau V). Korkmaz *et al* ont montré que l' α 1-PI peut également inhiber l'HNE liée aux membranes des neutrophiles après activation (Korkmaz *et al.*, 2005) bien que ces enzymes aient été décrites comme résistantes aux différents inhibiteurs (Owen *et al.*, 1995 ; Owen et Campbell, 1998 ; Owen et Campbell, 1999a, b).

L' α 1-PI présente un spectre large d'activité inhibitrice mais il est également la cible de nombreuses protéases, en particulier les protéases à cystéine et les MMPs qui peuvent l'inactiver. Johnson *et al.* ont démontré que la papaïne et la cathepsine B pouvaient inactiver l' α 1-PI (Johnson et Travis, 1977). Parmi les MMPs, la MMP-12, également appelée l'élastase de macrophage, clive dans la boucle inhibitrice entre les résidus Pro357(P2) et Met358(P1) (Banda, 1980). Les MMP-8 (collagénase) et MMP-9 (gélatinase B), produites par les neutrophiles, sont capables de cliver l' α 1-PI en N-terminal des résidus Phe352 et Pro357 respectivement (Desrochers, 1992). La leucolysine (MT-MMP-6) clive en C-terminal des résidus Phe376 et Pro381 (Nie et Pei, 2004). La MMP-7 (matrilysine) clive, comme la MMP-12, entre les résidus Pro357(P2) et Met358(P1) et après la Phe352 lorsque l'inhibiteur est oxydé (Zhang *et al.*, 1994). Le même site de clivage a été observé pour la MMP-3 (stromélysine) (Winyard *et al.*, 1991 ; Mast *et al.*, 1991). La MMP-1 peut également l'inactiver mais pas la MMP-2 (Mast *et al.*, 1991).

L' α 1-PI peut également être clivé par des protéases bactériennes comme la pseudolysine (métalloprotéase de *P. aeruginosa*) (Moriyama *et al.*, 1979), la TDP (Tissue-Destructive Protease) de *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) (Conlan *et al.*, 1988) et la métalloprotéase de *Serratia marcescens* (*S. marcescens*) appelée serralysine qui clive entre les résidus Met358(P1) et Ser359(P'1) (Virca *et al.*, 1982). La sensibilité de l' α 1-PI aux protéases bactériennes comme la thermolysine, l'auréolysine, la serralysine, la pseudolysine, la protéase à sérine de *S. aureus*, la streptopapaine et la peridontapaine dépend de l'état d'oxydation de l'inhibiteur (Rapala-Kozik *et al.*, 1999).

Il a été montré qu'un fragment de l' α 1-PI (fragment de 4,2 kDa avec la Ser359 en position N-terminale) libéré par l'HNE possède de fortes propriétés chimioattractantes pour les neutrophiles (Banda *et al.*, 1988). Les propriétés physico-chimiques du milieu dans lequel se trouve l' α 1-PI peuvent influencer les différents paramètres cinétiques de l'inhibiteur vis-à-vis de ses protéases cibles. En effet, l'oxydation de l' α 1-PI tend à diminuer significativement les constantes de vitesse d'association pour l'NE, $k_{\text{ass}}=3,1.10^4 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ au lieu de $6,5.10^7 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$ et une perte totale d'activité vis-à-vis de la PPE. Cette sensibilité aux oxydants est due à la présence de la méthionine Met358 en P1 qui peut se transformer en méthionine sulfoxyde et ainsi diminuer l'affinité de l' α 1-PI pour les protéases cibles (Beatty *et al.*, 1980). Cette propriété est d'autant plus importante que lors d'une réaction inflammatoire, des ROS et des RNS sont produits par les cellules de la défense immunitaire innée en réponse aux stimuli pro-inflammatoires. Ainsi l'inactivation de l' α 1-PI *in vivo* par clivage protéolytique et/ou oxydation, peut conduire au développement d'un emphysème pulmonaire dû à une forte activité protéolytique des NSPs et à la destruction non spécifique des tissus environnants perpétuant ainsi l'état inflammatoire.

b. L' α 1-antichymotrypsine (ACT)

L' α 1-antichymotrypsine (ACT) est un inhibiteur plasmatique des protéases à sérine de type chymotrypsine comme la CatG, la chymase et la chymotrypsine pancréatique (Tableau V). L'ACT est sécrété, comme pour l' α 1-PI, par les hépatocytes à un taux basal de 0,3 à 0,6 g/L et peut atteindre une concentration de 3 g/L dans des conditions inflammatoires (Calvin et Price, 1986 et Whicher *et al.*, 1991). L'ACT possède 45% d'identité de séquence avec l' α 1-PI. C'est une glycoprotéine constituée d'une seule chaîne polypeptidique d'environ 68 kDa. L'ACT est synthétisé sous forme d'un précurseur de 423 acides aminés. La protéine mature, de 400 acides aminés, possède deux sites de glycosylation sur les Asn 70 et 104. Les protéases cibles vont cliver entre les résidus Leu358(P1) et Ser359(P'1). Il est à noter que contrairement à l' α 1-PI, l'ACT est résistant à l'oxydation car il ne possède pas de méthionine dans la boucle réactive. L'ACT n'inhibe pas l'HNE, l'élastase pancréatique, la Pr3 et la trypsine.

L'ACT est sensible à de nombreuses protéases endogènes et d'origine microbienne. Les MMP-1 et MMP-3 peuvent l'inactiver mais pas la MMP-2 (Mast *et al.*, 1991). La MMP-8 est capable de l'inactiver en clivant la liaison peptidique entre les résidus Ala360(P'2) et Leu361(P'3) (Desrochers *et al.*, 1992). La pseudolysine est également capable de l'inactiver (Catanese et Kress, 1984). Les MMPs de *S. marcescens* et de *S. aureus* clivent au niveau de

boucle réactive entre les résidus Ser359(P'1) et Ala360(P'2) et entre Ile355(P4) et Thr356(P3) respectivement. L'HNE peut inactiver cette serpine mais elle semble être moins efficace que les trypsines pancréatiques humaines et bovines. La protéase V8 de *S. aureus* et la clostripaïne n'inactivent pas l'ACT car les sites de coupure se situent en N-terminal de la molécule. Comme pour l' α 1-PI, les fragments de protéolyse de l'ACT semblent avoir un fort pouvoir chimioattractant pour les neutrophiles (Potempa *et al.*, 1991). L'ACT est sensible aux gingipaïnes de *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) mais pas l' α 1-PI (Potempa *et al.*, 1998). L'ACT et l' α 1-PI joueraient un rôle dans le contrôle de la progression tumorale dans certains cancers comme ceux de la glande thyroïde (Naidoo *et al.*, 1995). Une grande quantité d'ACT existe sous forme latente (Chang et Lomas, 1998) et inactive dans les LLBA de patients atteints d'emphysème ou de bronchite chronique. La forme inactive ne s'explique ni par un clivage protéolytique ni par des phénomènes oxydatifs. Il a été montré qu'une forme mutée de l'ACT, provenant d'une mutation génétique, conduisant à la substitution de la Leu55 en Pro55, était associée à des maladies pulmonaires obstructives observées dans une même famille (Poller *et al.*, 1993). L'inefficacité de cet ACT L55P s'explique par une réorientation d'une partie de la boucle réactive dans le feuillet β A (Gooptu *et al.*, 2000).

2. Les serpines intracellulaires

Le MNEI pour *Monocyte Neutrophil Elastase Inhibitor* (ou serpine B1), le PI6 (*Proteinase Inhibitor 6* ou serpine B6) et le PI9 (*Proteinase Inhibitor 9* ou serpine B9) sont trois serpines intracellulaires d'environ 42 kDa, de la famille de l'ovalbumine. Les gènes qui codent pour ces trois inhibiteurs sont organisés en cluster situé sur le chromosome 6, au niveau du locus 6p25 (Zeng *et al.*, 1998 et Sun *et al.*, 1998). On retrouve ces trois serpines notamment au niveau du cytoplasme des cellules de l'immunité comme les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes. Leur rôle serait de contrôler une activité protéolytique intracellulaire non spécifique pouvant aboutir à des dommages irréversibles et au déclenchement de l'apoptose. Le SCCA2 (*Squamous Carcinoma Cell Antigen 2*) est également une serpine intracellulaire dont le gène SCCA2 est situé sur le locus 18q21.3 (Schneider *et al.*, 1995).

a. Le MNEI

Le MNEI est un puissant inhibiteur des trois NSPs, en particulier de l'HNE et de la Pr3, avec des k_{ass} de $3,4 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et $1,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ respectivement. La CatG semble être moins sensible (k_{ass} , $2,3 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Tableau V). Le MNEI inhibe également la PPE et la

chymase avec une stoechiométrie égale à 1. Cette capacité à inhiber des enzymes à la fois de type chymotrypsine et de type élastase s'explique par la présence de deux sites inhibiteurs fonctionnels dans la boucle réactive : la Phe343 et la Cys344, respectivement (Cooley *et al.*, 2001). Deux études ont montré que le MNEI pouvait prévenir la dégradation des protéines SpA et SpD par les NSPs purifiées et les LLBA de patients atteints de mucoviscidose (Rubio *et al.*, 2004 ; Cooley *et al.*, 2008). L'aérosolisation du MNEI dans un modèle d'infection à *P. aeruginosa* chez le rat, améliore la clairance bactérienne et diminue la réaction inflammatoire (Woods *et al.*, 2005). De même, les souris MNEI^{-/-} sont plus sensibles aux infections à *P. aeruginosa*. Une administration de MNEI restaure l'intégrité des défenses immunitaires (SpD) et prolonge la survie des souris (Benarafa *et al.*, 2007).

b. Le PI6

On retrouve cette serpine dans le cytoplasme des neutrophiles, des macrophages, des cellules endothéliales, des cellules du muscle cardiaque et des cellules du muscle squelettique (Coughlin *et al.*, 1993 et Scott *et al.*, 1999). Cet inhibiteur a pour cible des enzymes de type trypsine comme la kallicréine hK2, l'uPA, la plasmine, le facteur Xa et les monomères de tryptase β . Les résidus Arg341 et Cys342 constituent les résidus P1 et P'1, respectivement. Cet inhibiteur est un bon inhibiteur de la CatG avec un k_{ass} de $6,8 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Tableau V) (Scott *et al.*, 1999). Récemment, il a été montré que cette serpine est également capable d'inhiber l'HNE avec un k_{ass} estimé à $1,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ et que les souris déficientes pour cette serpine seraient plus résistantes aux infections à *P. aeruginosa* (Zhang *et al.*, 2007).

c. Le PI9

Le PI9 présente 49% d'identité de séquence avec le MNEI. Cette serpine est localisée dans le cytoplasme des cellules de l'immunité comme les lymphocytes T, les cellules dendritiques et les mastocytes mais aussi dans les cellules épithéliales pulmonaires (Bladergroen *et al.*, 2001 ; Bladergroen *et al.*, 2005). Il joue un rôle dans la régulation de l'apoptose car il peut inhiber la caspase-1 et le granzyme B. La caspase 1 est l'enzyme qui permet de libérer l'IL-1 β de son précurseur. C'est la première serpine humaine décrite capable d'inhiber à la fois des protéases à sérine et une protéase à cystéine (Annand *et al.*, 1999). Une étude récente a montré que cet inhibiteur régule l'apoptose en inhibant l'activité enzymatique des caspases-8 et -9 (Kummer *et al.*, 2007). Le centre réactif de cette serpine est formé par les résidus Glu340 et Cys341 en P1 et P'1, respectivement. Dahlen *et al* ont montré que le PI9

recombinant pouvait inhiber l'HNE avec un k_{ass} de $1,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ mais également des protéases d'origine bactérienne comme la subtilisine A (Tableau V) (Dahlen *et al.*, 1997).

d. Le SCCA2

Le SCCA est un marqueur sérologique pour les cancers épidermoïdes. Il existe deux gènes homologues (92% d'identité de séquence), *SCCA1* et *SCCA2* qui codent pour deux serpins SCCA1 et SCCA2. Ces serpins intracellulaires d'environ 45 kDa font également partie de la famille de l'ovalbumine. Le SCCA1 inhibe les cathepsines K, L et S alors que le SCCA2 inhibe la CatG et la chymase avec des k_{ass} de $1 \cdot 10^5$ et $3 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ respectivement (Schick *et al.*, 1997). Le SCCA2 inhibe également la Pr3 mais aucune valeur de k_{ass} n'a été déterminée (Tableau V) (Schick *et al.*, 1997). En 2004, Sakata *et al.* ont montré que la SCCA2 pouvait se comporter comme un substrat suicide vis-à-vis de Derp1 et ainsi inhiber son pouvoir pathogène (Sakata *et al.*, 2004).

C. Les inhibiteurs canoniques

Les inhibiteurs canoniques sont les inhibiteurs des protéases à sérine les plus nombreux. Il existe une vingtaine de familles qui possède une structure tridimensionnelle différente mais une conformation de la boucle inhibitrice exposée au solvant identique (P3-P'3), de ce fait appelée conformation canonique, malgré des séquences distinctes.

FAMILLE	NOMBRE DE MEMBRES	EXEMPLE(S)
BPTI	63	BPTI
Kazal	36	OMSVP3, OMTKY
Potato 1	27	CL-2, eglin c
Squash	17	CI-2, CPTI II
Ecotin	12	Ecotin
STI	11	STI
BBI	9	BBBI, MbBBI
BBI (SFTI)	2	SFTI-I
Antistasin	7	Hirustasin, bdellastasin
Ascaris	7	AMCI, C/E 1 inhibitor
Grasshopper	6	PMP-C
SSI	5	SSI
Potato 2	4	T1, PCI-1
Cereal	4	CHFI
Chelonianin	3	Elafin, SLPI
Rapeseed	1	ATT _p

Tableau VI : Les différentes familles des inhibiteurs canoniques. (D'après Krowarsch *et al.*, 2003).

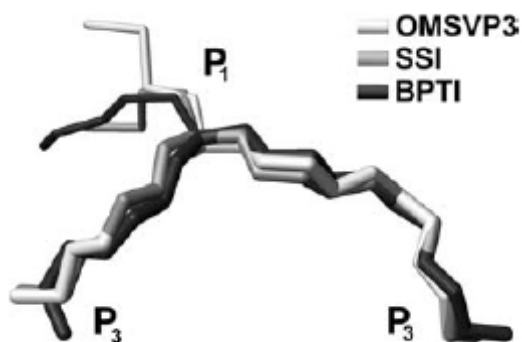
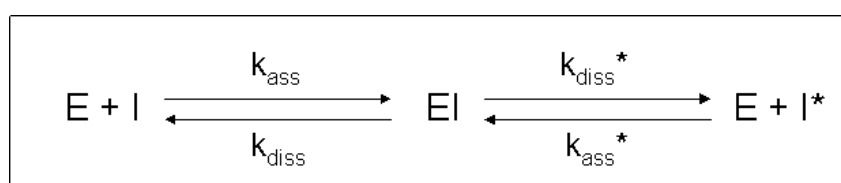


Figure 20 : Superposition des segments P3-P'3 des boucles inhibitrices de l'OMSVP3, du SSI et du BPTI. Les structures tridimensionnelles des segments P3-P'3 des boucles inhibitrices ont été obtenues à partir des fichiers PDB 2ovo, 3ssi et 5pti pour l'OMSVP3, du SSI et du BPTI. (D'après Krowarsch *et al.*, 2003).

Dans une même famille, les inhibiteurs partagent une structure tridimensionnelle similaire mais celle-ci diffère complètement d'une famille à l'autre (Tableau VI, Figure 20). Ces inhibiteurs ont une structure très compacte due notamment à la présence de plusieurs ponts disulfure, rendant ces inhibiteurs stables et résistants à la protéolyse (Figure 21). Ils interagissent avec leurs protéases cibles de façon très spécifique via leur boucle inhibitrice, boucle hautement complémentaire du site actif des protéases cibles, ce qui contribue à rendre ces interactions particulièrement fortes. Des ajustements conformationnels peuvent être nécessaires entre l'inhibiteur canonique et sa protéase cible, mais il est admis que la formation du complexe est le résultat de l'association de deux molécules rigides. Le mécanisme d'action de ces inhibiteurs peut être assimilé à un modèle clé-serrure.

Pratiquement tous les inhibiteurs canoniques répondent au schéma réactionnel minimum suivant appelé mécanisme standard (Laskowski Jr *et al.*, 2000).



Dans ce schéma réactionnel, E, I, EI et I* correspondent à l'enzyme libre, à l'inhibiteur libre, au complexe enzyme-inhibiteur et à l'inhibiteur clivé inactif respectivement. k_{ass} , k_{diss} , k_{ass}^* et k_{diss}^* sont les constantes de vitesse associées aux différentes étapes d'association ou de dissociation du complexe enzyme-inhibiteur.

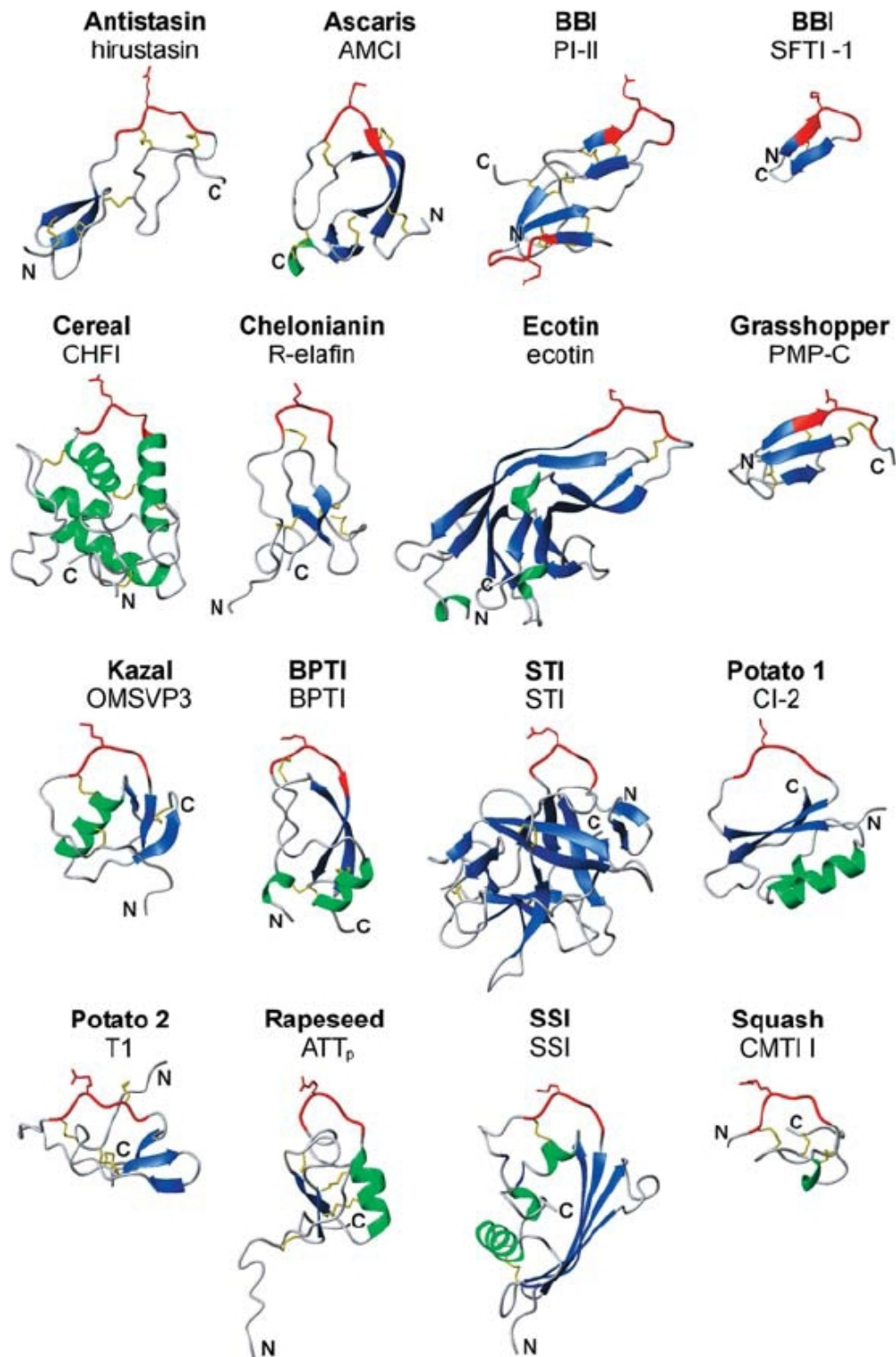


Figure 21 : Structure tridimensionnelle des membres représentatifs de chaque famille des inhibiteurs canoniques. La structure des inhibiteurs suivants est représentée : hirustasin (PDB : 1bx7), AMCI (PDB : 1ccv) ; PI-II (PDB : 1pi2), STFI-1 (1jbl), CHFI (PDB : 1bea), ecotin (PDB : 1ifg), PMP-C (PDB : 1bx7), OMSVP3 (PDB : 2ovo), BPTI (PDB : 5pti), STI (PDB : 1avu), CI-2 (PDB : 2ci2), T1 (PDB : 1tih), ATT_p (PDB : 1jxc), SSI (3ssi), CMTI I (PDB : 1lu0). La boucle inhibitrice et la chaîne latérale du résidu P1 sont indiquées en rouge. Les structures secondaires sont colorées en bleu (feuillet β) et en vert (hélice α) (D'après Krowarsh *et al.*, 2003).

La formation du complexe EI est un processus très rapide qui peut être assimilé à l'association d'une enzyme avec son substrat mais à la différence d'un substrat, la liaison P1-P'1 qui correspond au site actif de l'inhibiteur sera clivée très lentement. En conséquence, la dissociation des complexes EI en E+I ou E+I* est un phénomène très lent. Plus l'association de l'inhibiteur avec la protéase est rapide et la dissociation lente et plus l'inhibiteur sera efficace.

Différentes constantes cinétiques sont associées à ce mécanisme standard de réaction. La vitesse de formation du complexe EI à partir de l'inhibiteur natif I ou clivé I* est caractérisée par la constante de vitesse d'association d'ordre 2 appelée k_{ass} et k_{ass}^* tandis que la vitesse de dissociation du complexe EI est définie par la constante de vitesse d'ordre 1 appelée k_{diss} et k_{diss}^* si I ou I* est libéré. La constante d'équilibre de dissociation ou constante d'inhibition appelée K_i , permet d'évaluer l'affinité entre l'enzyme et l'inhibiteur dans le cas où le clivage de l'inhibiteur (I*) est négligeable :

$$K_i = \frac{[E] \cdot [I]}{[EI]} = \frac{k_{\text{diss}}}{k_{\text{ass}}}$$

D'une manière générale, un inhibiteur canonique sera d'autant plus efficace que son K_i vis-à-vis de la protéase cible est faible. De bons inhibiteurs possèdent des valeurs de K_i inférieures à 1 nM.

1. Les églines

Le terme « églina » est un acronyme pour « Elastase-cathepsin G Leech INhibitors » (Ascenzi *et al.*, 1995). Il s'agit de protéines de faible masse moléculaire isolées à partir d'extraits de sangsues médicinales (*Hirudo medicinalis*). Ces inhibiteurs ont été décrits pour la première fois par Seemuller *et al.* en 1977 (Seemuller *et al.*, 1977). Les églines b et c sont constituées d'une chaîne polypeptidique de 70 acides aminés et ne contiennent pas de ponts disulfure. Les séquences protéiques ne diffèrent que d'un seul acide aminé en position 35 : l'églina b possède un résidu His et l'églina c possède une Tyr. Cette mutation provient de la substitution d'une seule base dans l'ADNc et ne semble pas affecter les propriétés inhibitrices de l'églina c (Chang *et al.*, 1985). Les églines appartiennent à la famille de l'inhibiteur de

potato inhibitor 1 (« Potato Inhibitor 1 ») et elles inhibent de la même façon la chymotrypsine, la trypsine, la subtilisine, l'HNE et la CatG. L'égline c possède un K_i de $4,45 \cdot 10^{-8}$ M vis-à-vis de la chymase (Tableau VII) (Fink *et al.*, 1986).

Inhibiteurs	HNE	Pr3	CatG	PPE	Trypsine	Chymo.	Tryptase	Chymase	SCCE
SLPI	0,34 ^a 0,2 ^d 0,01 ^m	AI 1000 ^m	11 ^a 5 ^d	AI	3 ^k 51 ^k 23,6 ^k	0,4 ^k 1,3 ^k 0,22 ^k 0,26 ^a	0,58 ^a AI ^e	50 ^b	63,1 ^c
Elafine	0,6 ^f 0,17 ^g 0,08 ^h	2 ^g 0,12 ^h 9,5 ⁱ	AI	1 ^f 0,75 ^h	AI	AI	AI	AI	1600 ^k
Trappine-2	0,03 ^h 0,1 ^j	0,18 ^h 0,36 ^j	AI	0,32 ^h 0,78 ^j	AI	AI	AI	AI	ND
Egline b	0,23 ⁱ		0,25 ⁱ			0,3 ⁱ			
Egline c	0,2 ⁱ	I	0,28 ⁱ			0,7 ⁱ		44,5 ^e	

Tableau VII : Valeurs de K_i en nM pour l'interaction du SLPI, de l'élafine, de la trappine-2 et des églines b et c avec différentes protéases à sérine. (D'après ^a Wright *et al.*, 1999 ; ^b Walter *et al.*, 1996 ; ^c Franzke *et al.*, 1996 ; ^d Thompson et Ohlsson, 1986 ; ^e Sommerhoff, 2001 ; ^f Wiedow *et al.*, 1990 ; ^g Ying et Simon, 1993 ; ^h Zani *et al.*, 2004 ; ⁱ Baskova et Zavalova, 2001 ; ^j Doucet *et al.*, 2007 ; ^k Moreau *et al.*, 2008 ; ^l Wiedow *et al.*, 1993 ; ^m Gauthier *et al.*, 1982). AI : Aucune Inhibition ; ND : Non Déterminé ; I : Inhibition mais valeur de K_i non déterminée. Chymo. : Chymotrypsine.

Malgré l'absence de ponts disulfure, les églines sont très résistantes à la protéolyse et ne sont dégradées par la trypsine qu'après traitement acide (Chang *et al.*, 1985). L'égline c a été cristallisé en complexe avec la subtilisine A (Bode *et al.*, 1986) et la chymotrypsine (Frigerio *et al.*, 1992). La structure tertiaire de l'égline c se présente sous la forme d'un noyau hydrophobe possédant une boucle de surface (Gly40-Arg48) permettant l'interaction avec les protéases cibles (Bode *et al.*, 1986).

2. L'EPI-hNE4

L'EPI-hNE4 (ou DX-890, Depelstat) est un inhibiteur de 56 acides aminés, de 6231 Da, obtenu par phage display. Cet inhibiteur est dérivé du second domaine de type Kunitz de l'inter-alpha-trypsin inhibitor, appelé la bikunine. Cinq mutations, en position 3, 15, 18, 19 et

20, sont à l'origine des propriétés inhibitrices de l'EPI-hNE4 (Roberts *et al.*, 1992). La bikunine est un inhibiteur endogène ciblant de nombreuses protéases à sérine comme la trypsine, la chymotrypsine, la thrombine, les kallikréines, la plasmine, les facteurs IXa, Xa, XIa, XIIa, l'HNE et la CatG (Pugia *et al.*, 2007). L'EPI-hNE4 est un inhibiteur spécifique et puissant de l'HNE avec un K_i estimé à $5,45 \cdot 10^{-12}$ M, une vitesse de formation du complexe EI très élevée, $k_{ass}=8 \cdot 10^6$ M⁻¹.s⁻¹ et une vitesse de dissociation du complexe EI très lente (Delacourt *et al.*, 2002). Cet inhibiteur est stable dans différentes conditions de pH, de température et est résistant à l'oxydation contrairement à l' α 1-PI, le SLPI ou à l'élafine (Delacourt *et al.*, 2002). Il inhibe également l'HNE liée aux membranes des neutrophiles et l'HNE dans les surnageants d'expectoration de patients atteints de mucoviscidose (Attucci *et al.*, 2006). Il est résistant aux MMP-7, MMP-8, MMP-9, à la Pr3 et à la CatG mais peut être inactivé par la pseudolysine et la pepsine *in vitro*. Une administration intra-veineuse ou une instillation de cet inhibiteur permet de réduire les lésions induites par l'instillation d'HNE chez le rat (Delacourt *et al.*, 2002). Grimbert *et al.* ont montré que la nébulisation de l'EPI-hNE4 ne changeait pas ses propriétés inhibitrices, ce qui en fait un candidat potentiel en vue d'une thérapie anti-inflammatoire basée sur l'administration, par aérosol, d'inhibiteur d'HNE chez les patients atteints de mucoviscidose (Grimbert *et al.*, 2003). Des essais cliniques sont actuellement en cours.

3. Les chélonianines

Les inhibiteurs de la famille des chélonianines se caractérisent par la présence d'un ou de plusieurs domaines WAP (*Whey Acidic Protein*). Ces domaines sont composés de 8 résidus cystéine très conservés, impliqués dans la formation de 4 ponts disulfure qui stabilisent la structure compacte de l'inhibiteur. Ces domaines WAP ont été décrits pour la première fois chez des protéines isolées du lait de rongeurs (Campbell *et al.*, 1984). A ce jour, la famille des chélonianines n'est composée que de 3 membres. Le premier inhibiteur, appelé chélonianine, a été découvert chez la tortue caouanne (*Caretta caretta*). Egalement appelé « *Basic Protease Inhibitor* » ou RTPI (*Red sea Turtle Proteinase Inhibitor*), cet inhibiteur cible la trypsine et la subtilisine. Il est composé de deux domaines, un domaine de type Kunitz et un domaine WAP (Kato et Tominaga, 1979). Ensuite, deux autres inhibiteurs ont été découverts chez l'homme possédant des domaines WAP : le SLPI (*Secretory leukocyte Proteinase Inhibitor*) et l'élafine. Ces deux inhibiteurs ciblent principalement les trois NSPs aux niveaux des muqueuses et ont eu l'appellation de « *alarm antiproteases* » en raison de leur libération rapide et leurs rôles dans la régulation de la réaction inflammatoire (Sallenave, 2000).

Il existe d'autres protéines à domaine WAP chez l'homme. Les gènes codant pour ces différentes protéines sont regroupés dans le locus 20q12-13.1 sur le chromosome 20 (Clauss *et al.*, 2002). En plus de l'élafine et du SLPI, 12 protéines ont été décrites. Les séquences protéiques ne sont pas conservées, hormis les résidus cystéines. Les séquences correspondant aux possibles boucles inhibitrices sont très différentes de celles de l'élafine et du SLPI, ce qui suggère que ces protéines ne sont pas des inhibiteurs. De façon plus surprenante, bien que de nombreuses protéines à domaine WAP aient été décrites chez les autres mammifères, il n'existe pas d'orthologue de l'élafine chez le rat et la souris alors qu'il en existe pour le SLPI (Idoji *et al.*, 2008).

II. Le SLPI

A. Historique

Le SLPI a été caractérisé comme un inhibiteur d'HNE pour la première fois dans des sécrétions bronchiques par deux équipes (Hochstrasser *et al.*, 1972 et Ohlsson *et al.*, 1976). Le SLPI possède plusieurs noms, qui font référence aux tissus dans lesquels il a été caractérisé, comme l'HUSI-I (*HUman Seminal plasma Inhibitor-I*), le CUSI (*Cervix Uterine Secretion Inhibitor*), le BI (*Bronchial Inhibitor*), l'ALP (*AntiLeukoProtease*) ou encore le MPI (*Mucosal Proteinase Inhibitor*) (Fritz, 1988).

B. Structure du gène

Le gène humain codant pour le SLPI est situé sur le chromosome 20, au niveau du locus 20q12-13.2. Il est constitué de quatre exons et de trois introns pour une taille de 2,6 kb (Stetler *et al.*, 1986 et Kikuchi *et al.*, 1998). Les exons II et III codent pour le premier et le second domaine, respectivement. Cette organisation suggère que les deux domaines sont issus d'une duplication de gène, un événement qui a dû se produire il y a longtemps car l'identité de séquence entre les deux domaines n'est que de 30%. Aucun polymorphisme du gène codant pour le SLPI n'a été décrit à ce jour.

C. Structure de la protéine

La séquence en acides aminés et les propriétés physico-chimiques du SLPI ont été décrites en 1986 par deux équipes (Seemuller *et al.*, 1986 et Thompson *et al.*, 1986). Le SLPI est un petit inhibiteur d'HNE et de CatG de 11,7 kDa, non glycosylé, composé d'une seule chaîne peptidique de 107 acides aminés avec un pI d'environ 9,5 et une charge nette à pH neutre de +12. La structure tridimensionnelle du SLPI a été établie, en 1988, par cristallographie aux rayons X en complexe avec la chymotrypsine bovine (Grütter *et al.*, 1988).

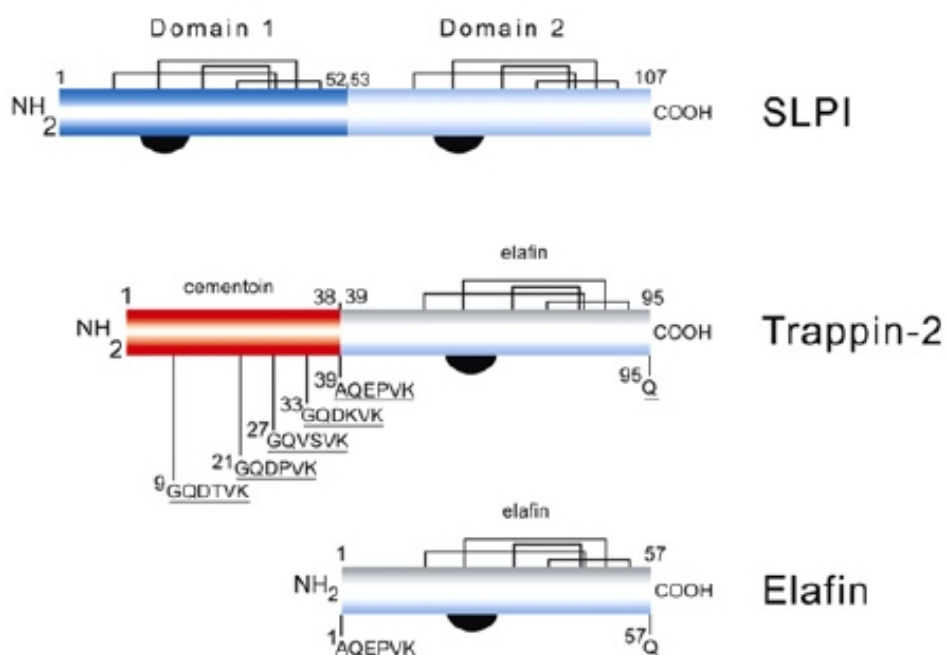


Figure 22 : Représentation schématique du SLPI, de la trappine-2 et de l'élafine. Les lignes noires représentent les ponts disulfure, les demi-cercles les boucles inhibitrices. Les séquences soulignées sont les séquences substrat de transglutaminase. (D'après Moreau *et al.*, 2008).

Il est composé de deux domaines WAP donnant à la molécule une forme en boomerang (Figure 22). La jonction entre le domaine 1 (Ser1-Val51) et le domaine 2 (Thr53-Ala107) s'effectue par l'Asp52 (Figure 23).

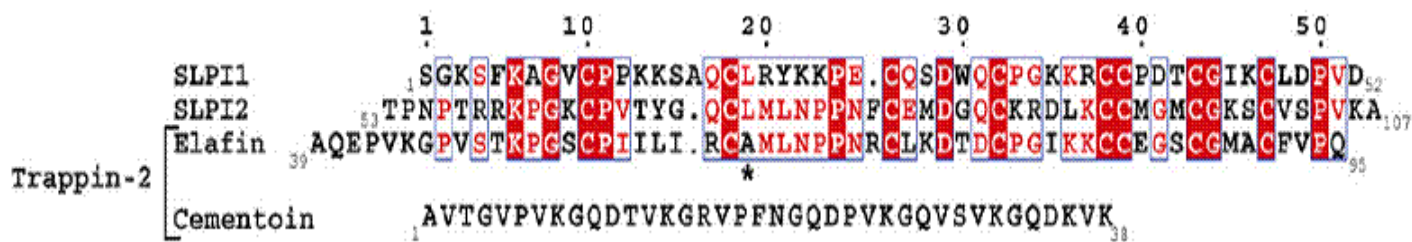


Figure 23 : Alignements de séquence entre le domaine N-terminal du SLPI (SLPI₁), le domaine C-terminal du SLPI (SLPI₂) et l'élafine. Le domaine cémentoine constituant la région N-terminale de la trappine-2, n'a pas de similarité de séquence avec les domaines WAP (D'après Moreau *et al.*, 2008).

Les deux domaines du SLPI sont homologues et se présentent sous la forme d'une spirale plane avec une partie exposée et une partie interne non hydrophobe, constituée d'un feuillet β et d'une boucle en épingle à cheveux (Figure 24). La séquence P1-P'1 est constituée par la Leu72 et la Met73. Ces deux résidus sont compris dans la boucle inhibitrice (P6)T₆₇YGQCLML₇₄(P'2) exposée au solvant (Figure 25). Il y a deux liaisons hydrogène établies par le groupement carboxyamide de la Gln70 avec les groupements carbonyles de la Cys71 (P2) et la Met73 (P'1) qui participeraient à la stabilisation de cette boucle inhibitrice en plus des 4 ponts disulfure. La Ser195 du site actif de la chymotrypsine bovine est en interaction avec la liaison peptidique entre la Leu72 et de la Met73 (liaison de Van der Waals). En dehors de la boucle inhibitrice, seuls la Val102 et le groupement indole de la chaîne latérale du Trp30 (appartenant au premier domaine) sont engagés dans des interactions de Van der Waals avec l'enzyme. Le domaine 1 présente également une boucle exposée au solvant. En alignant les Cys des boucles inhibitrices du premier et du second domaine, la boucle du premier domaine présente une délétion d'un résidu, une Leu en P1 et une Arg en P'1. Il a été suggéré que cette boucle correspondrait au site inhibiteur des enzymes « trypsin-like » mais selon certains auteurs, tout le potentiel inhibiteur du SLPI se situerait au niveau du second domaine (Eisenberg *et al.*, 1990 ; Kramps *et al.*, 1990 ; Meckelein *et al.*, 1990). La structure tridimensionnelle du complexe HNE- SLPI₂ a été élucidée récemment (Koizumi *et al.*, 2008). L'analyse du complexe (code PDB : 2Z7F) montre que le SLPI₂ interagit de la même façon avec l'HNE, que l'élafine avec la PPE. Le même nombre de liaisons hydrogène est établi par la région P3-P'2 des deux inhibiteurs en contact avec le site actif de ces deux protéases cibles. Les P1 différents des deux inhibiteurs (Leu72 et Ala25 pour le SLPI et l'élafine, respectivement) ne semblent pas être à l'origine des différences d'inhibition observées entre les deux protéases cibles. D'après ces auteurs, il semblerait que la Tyr68 (P5)

du SLPI₂ soit responsable de la non inhibition de la PPE par gêne stérique entre la Tyr68 et la région Ser169-Val176 de la PPE (Koizumi *et al.*, 2008).

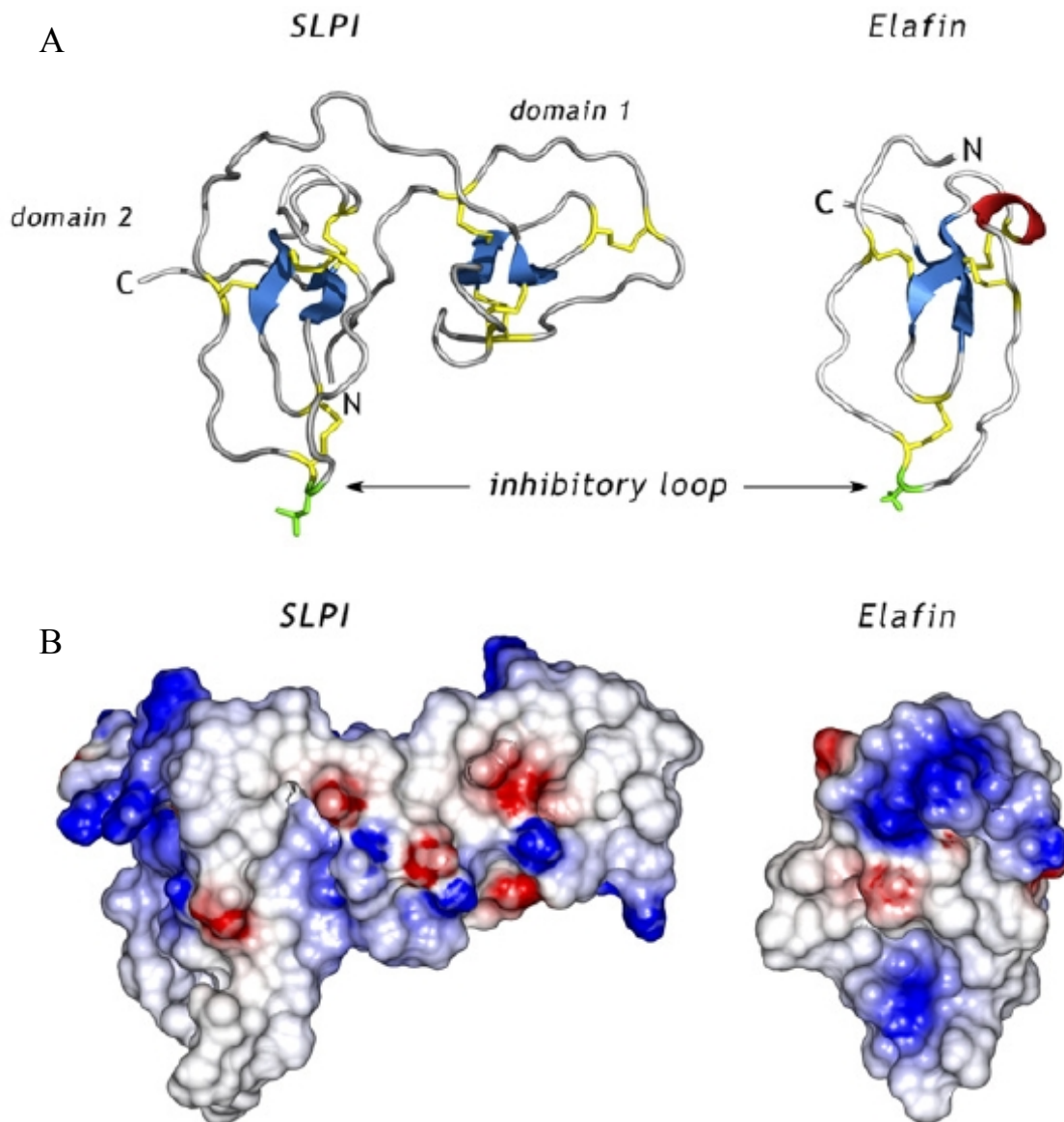


Figure 24 : Structure tridimensionnelle (représentation en ruban) du SLPI et de l'élafine. A. Les résidus P1 du SLPI (Leu72) et de l'élafine (Ala24) des boucles inhibitrices sont colorés en vert. Les feuillets β , les hélices α et les ponts disulfure sont colorés en bleu, rouge et jaune respectivement. N : N-terminal. C : C-terminal. B. Représentation des potentiels de surface du SLPI et de l'élafine. En bleu, les régions positives et en rouge, les régions négatives. (D'après Moreau *et al.*, 2008).

D. Propriétés inhibitrices

Le SLPI inhibe l'HNE et la CatG ainsi que la chymase, la chymotrypsine et la trypsine (Tableau VI). Une étude récente montre que le SLPI inhibe également l'ISP (*Implantation Serine Protease*), une protéase impliquée dans l'implantation de l'embryon dans l'utérus

(Sharma *et al.*, 2008). Seul le second domaine semble être inhibiteur. Bien que différentes études aient confirmé le rôle inhibiteur du domaine 2 (Eisenberg *et al.*, 1990 ; Kramps *et al.*, 1990 ; Meckelein *et al.*, 1990), il est tout de même à noter que la stoechiométrie 1:1 entre l'enzyme et l'inhibiteur observée avec l'HNE passe à 2:1 avec la CatG, la trypsine et la chymotrypsine lorsque les concentrations en enzyme et en inhibiteur sont de l'ordre du micromolaire (Boudier et Bieth, 1992). Le domaine 1 servirait d'une part à stabiliser le complexe HNE/SLPI (Ying *et al.*, 1994) et d'autre part à lier l'héparine de façon à moduler l'activité inhibitrice du SLPI. En effet, l'héparine augmente les capacités inhibitrices du SLPI vis-à-vis de l'HNE, une amélioration qui serait due à un changement de conformation de l'inhibiteur (Faller *et al.*, 1992a ; Faller *et al.*, 1992b).

La forte affinité du SLPI pour l'HNE et la CatG ainsi que sa concentration pulmonaire (environ 5 μM) fait de cet inhibiteur, le principal inhibiteur physiologique des NSPs, dans les voies aériennes supérieures, au niveau de la muqueuse respiratoire (Tournier *et al.*, 1983 ; Kramps *et al.*, 1984) où il peut représenter jusqu'à 90% du potentiel anti-élastase (Sallenave *et al.*, 1997). En revanche, au niveau des alvéoles, le SLPI ne contribue que faiblement à l'inhibition de l'HNE. En effet, l' $\alpha 1$ -PI diffuse du sang vers les alvéoles et se retrouve de trois à dix fois plus concentré que le SLPI (Kouchi *et al.*, 1993 et Kramps *et al.*, 1988). Bien qu'il ne soit pas l'inhibiteur principal de l'HNE au niveau des alvéoles, le SLPI est co-localisé avec les fibres d'élastine du parenchyme pulmonaire (Kramps *et al.*, 1988) et de la peau (Wingens *et al.*, 1998) lors d'une réaction inflammatoire. Cette co-localisation suggère tout de même un rôle important dans l'inhibition de l'activité de l'HNE *in vivo* au site de l'inflammation.

Il semblerait que la Pr3 puisse cliver le SLPI sans toutefois l'inactiver (Rao *et al.*, 1993). En revanche, le SLPI peut être inactivé par clivage protéolytique. En effet, les cathepsines B, L et S clivent la liaison peptidique entre les résidus Thr67(P6)-Tyr68(P5) de la boucle inhibitrice (Taggart *et al.*, 2001). De même, le PSA (*Prostate Specific Antigen* ou kallikréine 3 humaine) inactive le SLPI en clivant la liaison entre le P1 et le P'1 (Leu72-Met73) (Ohlsson *et al.*, 1995). Comme l'ACT, le SLPI est sensible aux protéases à cystéine d'origine bactérienne comme les gingipaïnes de *P. gingivalis* (Into *et al.*, 2006) et celles de *Trichomonas vaginalis* (Draper *et al.*, 1998). De même, la pseudolysine et la protéase à sérine de *S. aureus* inactivent le SLPI mais moins rapidement que l' $\alpha 1$ -PI, ce qui fait du SLPI, un inhibiteur potentiel dans le cadre d'un traitement anti-protéase chez des patients atteints de mucoviscidose infectés par *P. aeruginosa* (Sponer *et al.*, 1991). Le SLPI, comme l' $\alpha 1$ -PI, possède une Met en P'1. Lorsque cette méthionine est oxydée, le SLPI perd de l'affinité pour ces protéases cibles. Le SLPI oxydé reste inhibiteur de l'HNE bien que son K_i ($1,1 \cdot 10^{-8}$ M)

soit augmenté de 120 fois par rapport à celui du SLPI natif (Boudier et Bieth, 1994). Vis-à-vis de la CatG, le SLPI oxydé possède un K_i de l'ordre du micromolaire, ce qui laisse penser qu'il n'inhibe pas cette enzyme *in vivo* dans ces conditions. En présence d'héparine, le SLPI oxydé présente un K_i de 42 nM vis-à-vis de la CatG. En vue d'une thérapie anti-inflammatoire utilisant le SLPI, l'héparine constitue un bon adjuvant (Boudier *et al.*, 1999).

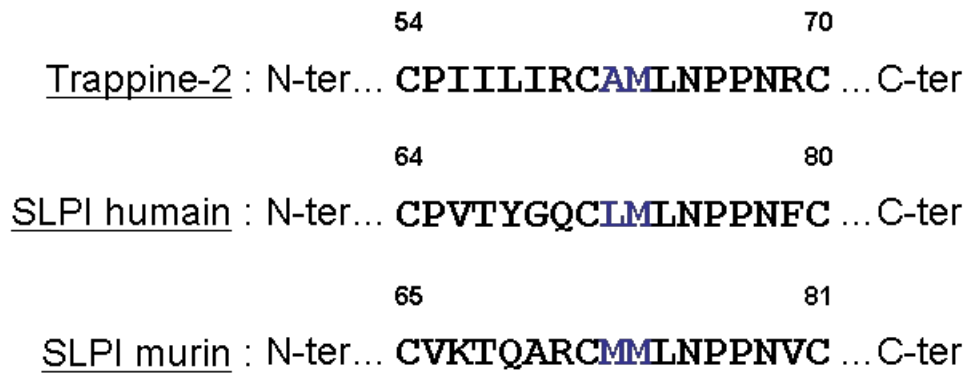


Figure 25 : Alignement de séquences des boucles inhibitrices du domaine élafine de la trappine-2 et du domaine 2 du SLPI humain et murin. Le P1-P'1 de chaque inhibiteur est coloré en bleu.

Le SLPI possède un orthologue murin (Figure 25). Une étude réalisée par Wright *et al.* a comparé l'efficacité des SLPI humain et murin (mSLPI) vis-à-vis des protéases humaines et murines (HNE, CatG, mNE, mCatG). Ils ont montré que le mSLPI inhibe la mNE et la mCatG avec des K_i de 5 et 0,12 nM, respectivement. De plus, le mSLPI inhibe également l'HNE et la CatG avec des K_i de 1,4 et 90 nM, respectivement. Le SLPI humain inhibe également la mNE et la mCatG avec des K_i de 0,02 nM pour les deux protéases. Dans leurs expériences, ils ont déterminé des K_i de 0,3 et 10 nM entre le SLPI avec l'HNE et la CatG, respectivement. Il semblerait que le SLPI soit plus actif vis-à-vis des protéases murines que des protéases humaines (Wright *et al.*, 1999). Une étude plus récente a montré que l'HNE et la mNE ont les mêmes activités protéolytiques vis-à-vis de la chaîne B de l'insuline. Ces deux protéases sont inhibées de la même façon par le SLPI et la mNE semble être plus sensible à l' α 1-PI que l'HNE (Wiesner *et al.*, 2005).

E. Expression du SLPI

Le SLPI est produit de façon constitutive au niveau des différentes muqueuses mais aussi par les cellules de l'inflammation comme les macrophages et les neutrophiles. Il est produit par les cellules épithéliales comme les cellules épithéliales pulmonaires (Doumas *et*

al., 2005), les kératinocytes (Wingens *et al.*, 1998) et les cellules épithéliales buccales (Jana *et al.*, 2005). Sa production est augmentée en réponse à des stimuli pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-1 β (Sallenave *et al.*, 1994) mais aussi en réponse à la progestérone (King *et al.*, 2003), à *P. aeruginosa* (Vos *et al.*, 2005), à l'IL-1 α (Bando *et al.*, 2007) et en réponse au virus HIV-1 (Jana *et al.*, 2005). Le SLPI va également être produit en réponse au LPS et au LTA par les macrophages et va contrôler la réponse inflammatoire (Jin *et al.*, 1998a, b). Les défensines libérées par les neutrophiles et l'HNE sont capables de moduler la libération du SLPI par les cellules épithéliales bronchiques. Les défensines vont augmenter la libération du SLPI dans le milieu sans augmenter la synthèse d'ARN messager. Cet effet sécrétagogue des défensines est amélioré en présence d' α 1-PI. L'HNE, quant à elle, va augmenter la production et la concentration intracellulaire du SLPI sans augmenter sa libération dans le milieu (van Wetering *et al.*, 2000b). Sullivan *et al.* ont montré que l'HNE et la CatG pouvaient réguler la concentration du SLPI produit par les cellules épithéliales pulmonaires dans des surnageants de culture (Sullivan *et al.*, 2008).

La production du SLPI est augmentée chez les patients atteints de la maladie de Wegener (Ohlsson *et al.*, 2003). Une partie du SLPI produit par les macrophages n'est pas sécrétée. Ce SLPI reste localisé dans le cytoplasme et serait impliqué dans la régulation de la réponse inflammatoire (Zhu *et al.*, 1999). A l'inverse, différentes études ont montré que la production du SLPI peut également être diminuée. En effet, Schmid *et al.* ont montré que la production de SLPI et d'élafine est fortement diminuée chez les patients atteints de la maladie de Crohn (Schmid *et al.*, 2007). Fakioglu *et al.* ont montré que les Herpes Simplex Virus-1 et -2 (HSV-1 et -2), mais pas le HIV-1 (*Human Immunodeficiency Virus-1*), sont capables de réduire la production du SLPI par les cellules épithéliales utérines, diminuant ainsi la défense immunitaire anti-virale (Fakioglu *et al.*, 2008).

Dans la salive, la concentration du SLPI est comprise entre 0,35 à 2 μ M (MacNeely *et al.*, 1995 ; Shugars *et al.*, 1999). Au niveau pulmonaire, chez des patients sains, le SLPI est plus concentré dans les voies aériennes supérieures (8,7 μ M) que dans les alvéoles (0,6 μ M) (Moreau *et al.*, 2008). De plus, il a été montré que seulement un tiers du SLPI est actif dans les sécrétions bronchiques. Bien que sa structure soit intacte, il ne se complexe pas aux protéases, ce qui pourrait s'expliquer par l'oxydation de la Met en P¹ (Vogelmeier *et al.*, 1991). Des concentrations similaires en SLPI ont été décrites 10 ans plus tard par Taggart *et al.* chez des patients sains. En revanche, chez des patients atteints d'emphysème pulmonaire, les concentrations en SLPI semblent être plus faibles (Taggart *et al.*, 2001). Le SLPI possède un orthologue chez la souris, le rat et le mouton. Une étude récente a montré que l'expression

du SLPI murin, dans un modèle d'emphysème pulmonaire, n'est pas influencée par l'exposition prolongée à la fumée de cigarette (Shibata *et al.*, 2008). En revanche, dans un modèle de BPCO chez le rat, l'expression du SLPI est diminuée par le TGF- β (Luo *et al.*, 2008). Il est à noter que le TGF- β est impliqué dans les différentes pathologies inflammatoires pulmonaires chez l'homme (Araya *et al.*, 2007 ; De Boer *et al.*, 2007b).

III. L'élafine et son précurseur : la trappine-2

A. Historique

Jusqu'au début des années 80, seulement trois inhibiteurs endogènes d'élastase étaient connus : l' α 2M, l' α 1-PI et le SLPI. En 1981, Hochstrasser *et al.* ont isolé et caractérisé pour la première fois dans les sécrétions bronchiques, un inhibiteur de petite taille nommé ESI (*Elastase-Specific Inhibitor*), spécifique de l'HNE et différent des inhibiteurs précédemment cités (Hochstrasser *et al.*, 1981). En 1985, Kramps *et al.* ont montré que l'ESI possède une constante d'inhibition de l'ordre du nanomolaire vis-à-vis de l'HNE et de la PPE (Tableau VI). Contrairement au SLPI, l'ESI n'inhibe pas la CatG et la trypsine bovine (Kramps et Klasen, 1985).

L'ESI a été isolé par deux groupes indépendants à partir de squames de peau de patients atteints de psoriasis, qui l'ont appelé SKALP (*Skin-derived AntiLeukoProtease*) (Schalkwijk *et al.*, 1990) et élafine (Wiedow *et al.*, 1990). L'ESI a été ensuite purifié à partir d'expectorations pulmonaires (Sallenave et Ryle, 1991 et Sallenave *et al.*, 1992). L'analyse de la séquence en acides aminés de l'élafine, de SKALP et de l'ESI a montré qu'il s'agissait de la même molécule et que cet inhibiteur présentait des similitudes de séquences avec le SLPI (40% d'identité de séquence avec chacun des domaines du SLPI). Comme les deux domaines du SLPI, l'élafine contient les 8 cystéines conservées, formant quatre ponts disulfure, caractéristiques des domaines WAP. (Figures 22 et 23).

Le clonage du gène de l'élafine a révélé, au niveau de la séquence protéique, la présence d'une extension N-terminale, absente chez le SLPI, non impliquée dans l'activité inhibitrice (Saheki *et al.*, 1992 ; Molhuizen *et al.*, 1993 ; Sallenave et Silva, 1993). L'extension N-terminale, de cette pré-élafine également appelée domaine cémentoïne, est composée de 38 résidus contenant quatre séquences répétées GQDPVK, séquences consensus substrats de transglutaminases tissulaires (TGases) (Nara *et al.*, 1994). Sous l'action de

TGases, les molécules possédant ces séquences substrats vont pouvoir être ancrées, de façon covalente, aux protéines de la matrice extracellulaire.

Le domaine WAP de 57 acides aminés correspondant à l'élafine est localisé en C-terminal de la pré-élafine (Figure 23). Cette structure particulière de la pré-élafine, formée d'un domaine substrat de TGase et d'un domaine WAP, ne se retrouve dans aucune autre protéine chez l'homme. Cependant, le clonage du gène codant pour la protéine SPAI-2 (*Sodium/Potassium ATPase Inhibitor-2*) isolée du duodénum de porc a montré des homologies avec la pré-élafine et une organisation génomique similaire. Cette famille de gènes a été nommée trappine, en anglais « trappin » qui est un acronyme pour « *TR*ansglutaminase substrate and *w*AP domain containing *Pro*teIN » (Zeeuwen *et al.*, 1997). Les membres de cette famille sont constitués de deux domaines fonctionnels : en N-terminal, un domaine riche en séquences GQDPVK, séquences substrats de TGase et en C-terminal, un domaine WAP. SPAI-2 et la pré-élafine portent respectivement les noms de trappine-1 et trappine-2 (T2), le numéro faisant référence à l'ordre chronologique d'identification des protéines. On retrouve des trappines dans différentes espèces comme les singes, les bovins, les cochons et les ovins (Schalkwijk *et al.*, 1999 et Brown *et al.*, 2004). Furutani *et al.* ont décrit la première trappine caractérisée chez les rongeurs (Furutani *et al.*, 2005).

B. Structure du gène

La T2 est codée par le gène *PI3*, situé sur le même chromosome et la même région, 20q12-13, que le gène codant pour le SLPI. Ce gène fait environ 1,7 kb et est composé de 3 exons et 2 introns. Le premier exon code pour une partie 5' non traduite, le peptide signal et les premiers acides aminés du domaine cémentoïne. Le second exon code pour le reste de la protéine et le troisième pour une partie 3' non traduite (Molhuizen *et al.*, 1993). Le gène *PI3* possède une forte similarité avec les gènes de la famille REST. Les gènes de la famille REST (*Rapidely Evolving Seminal vesicle Transcribed*) codent un groupe de protéines substrats de TGases localisées dans les vésicules séminales. Ces gènes possèdent la même organisation génétique en 3 exons et 2 introns (Lundwall et Ulvsback, 1996). La T2, comme le SLPI, est constituée de deux domaines et pourrait avoir évolué par « exon shuffling », vu que le gène *PI3* et les gènes du SLPI et ceux de la famille REST sont colocalisés sur le chromosome 20 (Schalkwijk *et al.*, 1999). Le gène *PI3* présente 23 polymorphismes ou SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), dont 11 sont situés au niveau du promoteur, ce qui suggère que

ces SNP peuvent influencer l'expression de ce gène dans les différents tissus (Chowdhury *et al.*, 2006).

C. Structure de la protéine

La T2 est une protéine traduite sous la forme d'un précurseur de 117 acides aminés comprenant un peptide signal en N-terminal de 22 résidus, suivi du domaine cémentoïne (38 résidus) et du domaine élaïne (57 résidus). La présence d'un peptide signal indique que cette protéine est sécrétée dans le milieu extracellulaire sous forme de T2 (Figure 23). La présence de l'élaïne dans les expectorations bronchiques et au niveau de la peau, implique que la T2 subit un clivage protéolytique *in vivo* pour libérer le domaine élaïne. Il a été montré au laboratoire que la tryptase du mastocyte pouvait libérer spécifiquement, à des concentrations physiologiques, l'élaïne à partir de la T2 (Guyot *et al.*, 2005a). De l'élaïne est générée en incubant de la T2 avec des mastocytes activés par l'ionophore calcique A23187 ou des IgE. Dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose, la génération d'élaïne à partir de T2 est inhibée en présence d'un anticorps polyclonal dirigé contre la tryptase de mastocytes. Ceci suggère que la tryptase pourrait être impliquée physiologiquement dans la génération de l'élaïne (Guyot *et al.*, 2005a). La T2 est une protéine de 95 acides aminés, non glycosylée, de 10 kDa avec un pI d'environ 9 pour une charge nette de +7 à pH neutre. L'élaïne est une protéine de 57 résidus, de 6 kDa avec le même point isoélectrique mais une charge nette à pH neutre de +3 (Figures 23 et 24).

1. Le domaine élaïne

Le domaine élaïne est un domaine WAP, globulaire, dont la structure compacte est maintenue par 4 ponts disulfure, essentiels à son activité inhibitrice (Tsunemi *et al.*, 1992). La structure tridimensionnelle de l'élaïne seule a été établie par spectroscopie RMN (Francart *et al.*, 1997) et par cristallographie aux rayons X pour l'élaïne complexée à la PPE (Tsunemi *et al.*, 1993 et Tsunemi *et al.*, 1996). L'élaïne se présente sous la forme d'une spirale plane avec une partie exposée et une partie interne constituée d'un feuillet β et d'une boucle en épingle à cheveux. A partir du complexe élaïne/PPE, les résidus P1-P'1 de l'inhibiteur ont pu être déterminés. Il s'agit de l'Ala24 et de la Met25 (numérotation T2 : Ala62-Met63) (Figure 25). Ces deux résidus sont compris dans la boucle inhibitrice (P6)I₁₉LIRCAML₂₆(P'2) exposée au solvant. Il y a deux liaisons hydrogène, entre le groupement guanidinium de la chaîne latérale

de l'Arg22 (P3) avec la Met25 (P'1) et entre le groupement amine de la Cys23 (P2) avec la Ser48, qui participeraient à la stabilisation de cette boucle inhibitrice en plus des 4 ponts disulfure. La Ser195 du site actif de la PPE est en interaction avec la liaison peptidique entre l'Ala24 et la Met25 de l'élafine par une interaction de Van der Waals. De même, les résidus Ser48, Cys49 et Ala52, situés au niveau de la boucle en épingle à cheveux de l'élafine, stabiliseraient le complexe élafine/PPE via des interactions de Van der Waals et des liaisons hydrogène (Tsunemi *et al.*, 1996). L'étude de ce complexe n'a pas permis de résoudre la structure de l'extrémité N-terminale de l'élafine (Ala1 à Ser10) qui semble être très flexible. Une étude *in silico* de modélisation moléculaire a montré que la région N-terminale, de la Lys6 à la Thr11, pouvait former une courte hélice α dans un milieu apolaire comme dans une membrane lipidique (Efremov *et al.*, 2001). Ceci suggère que l'élafine pourrait s'associer aux membranes grâce à cette région.

2. Le domaine cémentoïne

La structure du domaine cémentoïne reste encore inconnue à ce jour. Ce domaine est riche en séquences hexapeptidiques répétées de type GQDPVK, séquences substrats de TGase (Figure 22). Ces séquences hexapeptidiques sont similaires à celles retrouvées dans des protéines comme l'involucrine, la cornifine et les protéines des vésicules séminales du cochon d'inde, SVP-1 (*Seminal Vesicle Protein-1*) qui sont des substrats de TGase (Nara *et al.*, 1994). La T2 possède 5 séquences substrats de TGase dont 4 sont situées dans le domaine cémentoïne et une en N-terminal du domaine élafine. Ces séquences sont riches en résidus Lys et Gln, respectivement accepteur et donneur d'acyl. La TGase est capable de former une liaison isopeptidique intermoléculaire (liaison ϵ -(γ -glutamyl)lysine) entre deux protéines dont une au moins possède une séquence de transglutamination. Nara *et al.* ont montré que la T2 pouvait être liée à la laminine *in vitro*, de même, Zeeuwen *et al.* ont montré que des variants biotinylés de cette séquence (GQDPVK) pouvaient être liés sur différentes protéines de la matrice extracellulaire (Nara *et al.*, 1994 ; Zeeuwen *et al.*, 1997) (Figure 26).

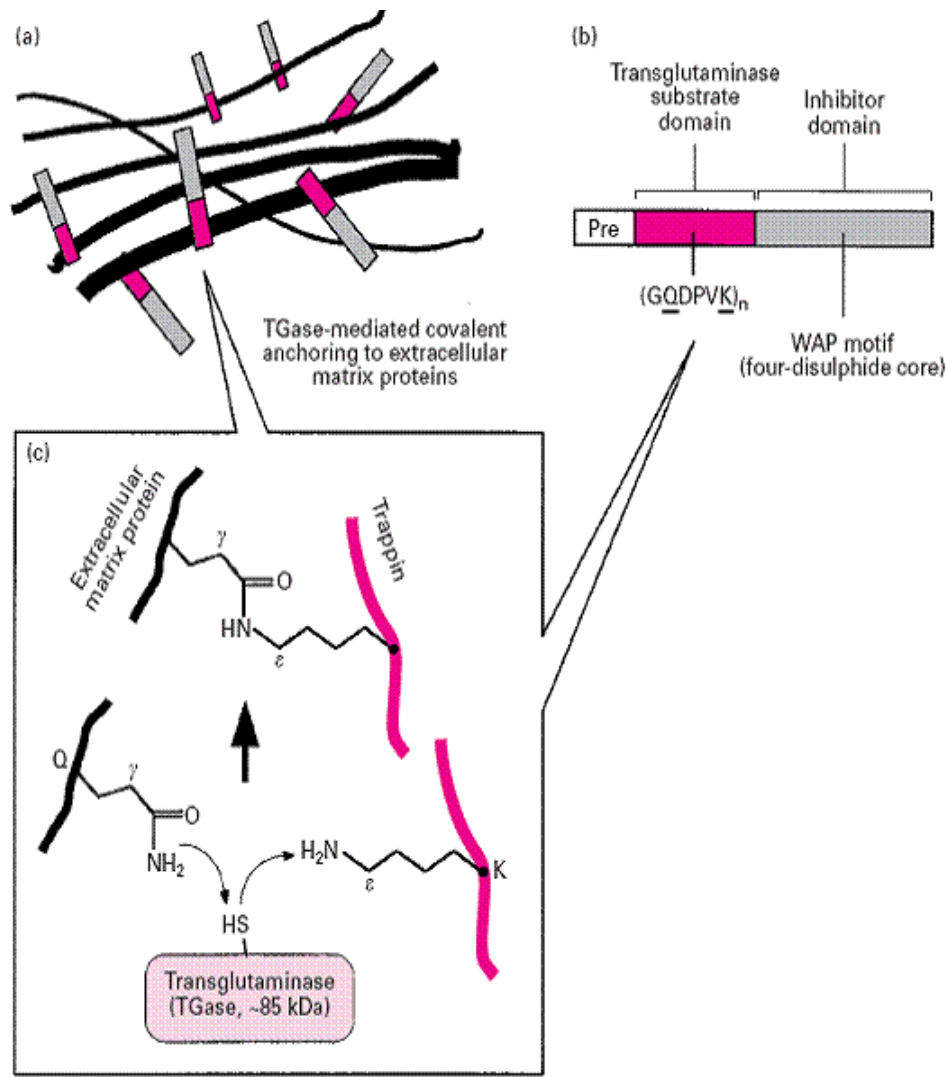


Figure 26 : Mécanisme de fixation de la trappine-2 à des protéines de la matrice extracellulaire par transglutamination. Les transglutaminases sont des enzymes qui possèdent un groupement thiol actif dans leur site actif (*HS*) (D'après Schalkwijk *et al.*, 1999).

Des études ont montré que l'élafine et/ou la T2 pouvaient être détectées, par western blot, sous forme de complexes de masses moléculaires supérieures aux masses initiales des inhibiteurs (Molhuizen *et al.*, 1993 et , Nara *et al.*, 1994). Ces résultats ont été confirmés par l'étude de Steinert et Marekov, qui montre que la T2 est pontée à différentes protéines de la peau comme la loricrine, la desmoplakine et la kératine 1 et joue un rôle dans la structuration de la couche cornée de l'épiderme (Steinert et Marekov, 1995) (Figure 27). Ce rôle structural dans la couche cornée a été également montré chez des patients atteints de psoriasis (Nakane *et al.*, 2002).

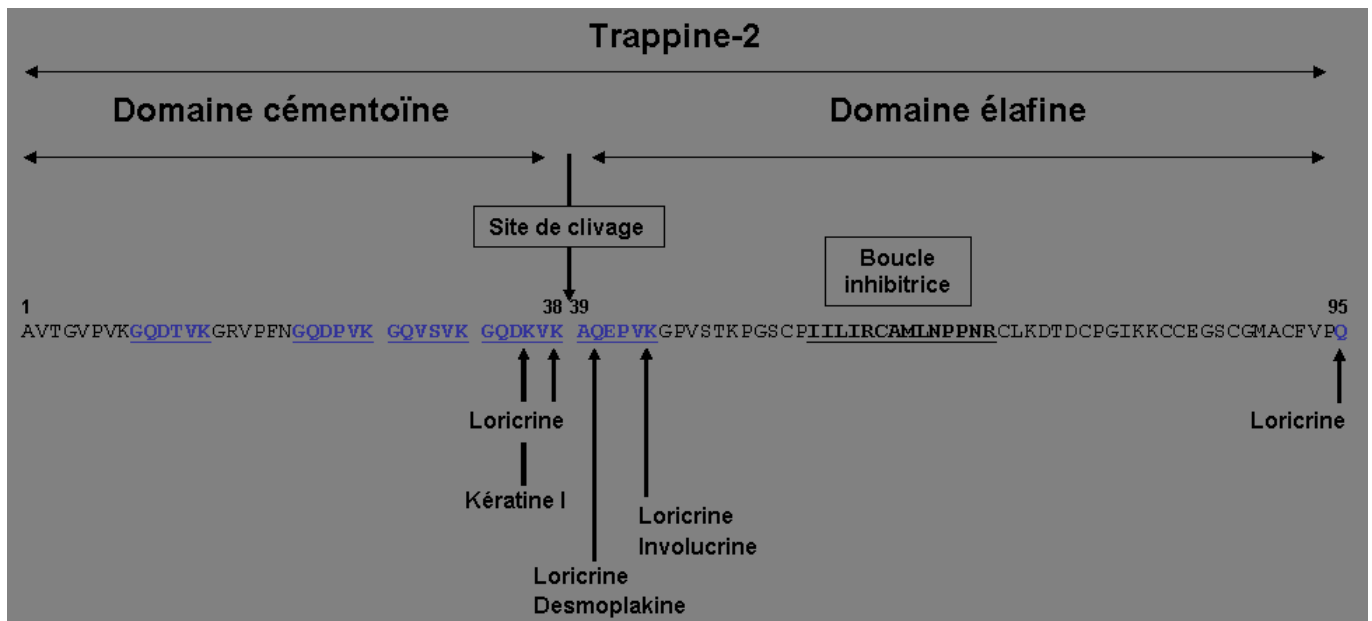


Figure 27 : Localisation des résidus de la trappine-2 impliqués dans la réaction de transglutamination avec des protéines de la couche cornée de l'épiderme. Les peptides issus de l'hydrolyse des protéines de la couche cornée, par la trypsine et la protéase K, ont été analysés par séquençage N-terminal (D'après Steinert et Marekov, 1995).

Les TGases sont des enzymes (EC.2.3.2.13) qui possèdent un groupement thiol actif dans leur site actif. Leur activation est dépendante du calcium. Les TGases peuvent catalyser plusieurs types de réaction : a) un transfert d'acyl entre le groupement γ -carboxyamide d'une chaîne latérale de Gln et le groupement ϵ -amine d'une chaîne latérale de Lys pour former une liaison isopeptidique (liaison ϵ -(γ -glutamyl)lysine) ; b) une incorporation de polyamines au niveau du groupement γ -carboxyamide d'une chaîne latérale de Gln ; c) la déamidation du groupement γ -carboxyamide d'une chaîne latérale de Gln et d) l'hydrolyse de la guanosine triphosphate en guanosine diphosphate. A ce jour, 9 TGases ont été décrites chez l'homme : 7 TGases tissulaires (TGase de type 1 à 7), une TGase plasmatique (le facteur XIIIa ou FXIIIa) et une TGase membranaire inactive (Band 4.2) (Tableau VIII) (Violante *et al.*, 2001).

La TGase tissulaire de type 2 est une enzyme ubiquiste alors que les TGases tissulaires de type 1 et 3 sont plutôt localisées au niveau de la peau. Les TGases tissulaires humaines possèdent sensiblement les mêmes activités catalytiques (mêmes séquences substrats de TGase) que la TGase tissulaire de type 2 de foie de cobaye (TGase2). C'est pourquoi, la TGase2 (80 kDa) est la plus souvent utilisée *in vitro* pour étudier les propriétés de transglutamination d'un substrat.

Noms	Synonymes	Taille (kDa)	Tissu	Localisation
TG1	TGK (Kératinocyte), type 1 TG	90	Epithelia	Cytosolique et membranaire
TG2	TGC, tissue TG, type 2 TG	80	Ubiquiste	Cytosolique, Nucléaire, Extracellulaire
TG3	TGG, type 3 TG	77	Epithelia	Cytosolique
TG4	TGP, prostate TG, type 4 TG	77	Prostate	Extracellulaire
TG5	TGX, type 5 TG	81	Epithelia	Cytosolique
TG6	TGY, type 6 TG	?	?	?
TG7	TGZ, type 7 TG	80	Ubiquiste	?
FXIII	facteur XIIIa, plasma TG, Fibrin Stabilizing factor	83	plasma sanguin, plaquette	Extracellulaire
Band 4.2	Erythrocyte protein band 4.2	77	Erythrocytes	Membranaire

Tableau VIII : Les différentes transglutaminases de mammifères. (D'après Griffin *et al.*, 2002).

Le FXIII, également appelé facteur de Laki-Lorand, est synthétisé sous forme d'un zymogène inactif qui sera activé en FXIIIa par la thrombine, en présence de calcium. Le FXIII est une glycoprotéine de 320 kDa, constituée par l'association de deux sous-unités A (83 kDa), catalytiques et de deux sous-unités B (76,5 kDa), non catalytiques. On le retrouve dans le plasma, les plaquettes, les monocytes et les macrophages. Il intervient dans la coagulation sanguine. Il stabilise la formation des caillots de fibrine. Il les rend plus élastiques et plus résistants à la protéolyse (Lorand, 2001). Une étude *in vitro* des substrats préférentiels de transglutamination de la TGase2 et du FXIIIa, a montré que ces deux enzymes ne possèdent pas les mêmes spécificités enzymatiques et que le peptide GQDPVK, retrouvé dans la T2, n'est pas une séquence substrat pour le FXIIIa (Sugimura *et al.*, 2006). En revanche, ces deux enzymes sont capables de lier des protéines avec des amines libres comme la dansyl-cadavérine (*Dsc*) et la putrescine sur l' α 2M. L' α 2M ne possède pas de séquence de transglutamination (Figure 28). Il y a toutefois deux sites potentiels de transglutamination, un doublet Gln, situé à 12 et 13 acides aminés en amont du site de clivage de l'HNE. Les expériences *in vitro* ont montré que la seconde Gln du doublet est le site majoritaire avec 93% d'incorporation (Mortensen *et al.*, 1981).

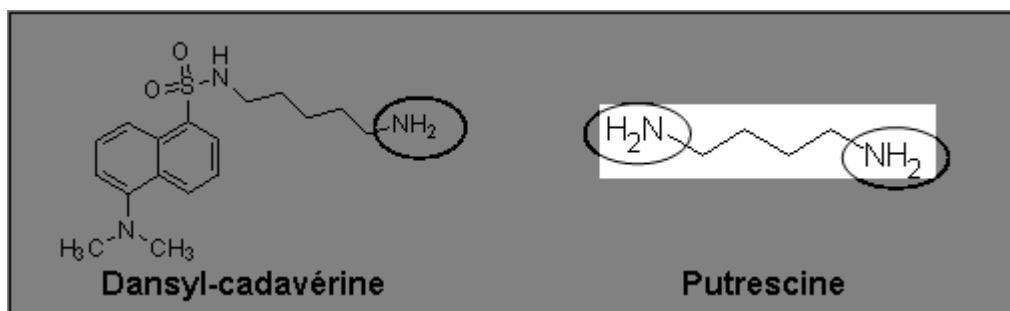


Figure 28 : Structure de la putrescine et du dansyl-cadavérine, molécules substrats de transglutaminase. Les amines réactives de chaque molécule sont entourées.

D. Propriétés inhibitrices

L'élafine a un spectre d'activité anti-protéase beaucoup plus restreint que le SLPI. En effet, l'élafine est un puissant inhibiteur des élastases d'origine leucocytaire et pancréatique ainsi que de la Pr3 (Wiedow *et al.*, 1991 et Ying et Simon, 2001). L'élafine n'inhibe pas la tryptase de mastocyte ni les granzymes (Tremblay *et al.*, 2000). Bien que l'élafine n'inhibe que faiblement la SCCE (*Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme* ou kallicréine humaine 7), elle pourrait, selon certains auteurs, participer à la régulation de l'activité protéolytique de cette protéase dans le processus de desquamation, comme le SLPI (Franzke *et al.*, 1996).

Il a été montré que l'élafine et la T2, produites par synthèse chimique, possèdent les mêmes propriétés inhibitrices vis-à-vis de l'HNE (Simpson *et al.*, 1999). Des résultats similaires ont été décrites par Bourbonnais *et al.* en comparant l'activité inhibitrice d'une T2 recombinante produite dans la levure *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*), avec un His-tag en C-terminal, et de l'élafine purifiée (Bourbonnais *et al.*, 2000). Ces résultats ont été également vérifiés au laboratoire avec de l'élafine et de la T2 exprimée sans « tag », dans la levure *Pichia pastoris*. Les deux inhibiteurs possèdent les mêmes activités inhibitrices vis-à-vis de l'HNE et de la Pr3. Ce sont de très bons inhibiteurs de l'HNE et de la Pr3 avec des valeurs de K_i de l'ordre de 10^{-10} M (Tableau IX) (Zani *et al.*, 2004).

Enzymes	Elafine			Trappine-2		
	$k_{ass} (M^{-1}.s^{-1})$	$k_{diss} (s^{-1})$	$K_i (M)$	$k_{ass} (M^{-1}.s^{-1})$	$k_{diss} (s^{-1})$	$K_i (M)$
HNE	$3,7.10^6$	$3,2.10^{-4}$	$0,8.10^{-10}$	$3,6.10^6$	$1,1.10^{-4}$	$0,3.10^{-10}$
Pr3	$3,3.10^6$	4.10^{-4}	$1,2.10^{-10}$	2.10^6	$3,7.10^{-4}$	$1,8.10^{-10}$
PPE	ND	ND	$7,5.10^{-10}$	ND	ND	$3,2.10^{-10}$

Tableau IX : Constantes cinétiques de l'inhibition de l'HNE, de la Pr3 et de la PPE par l'élafine et la trappine-2. (D'après Zani *et al.*, 2004).

Une étude réalisée au laboratoire a montré qu'en plus de la laminine (Nara *et al.*, 1994) et de l'élastine (Muto *et al.*, 2007), la T2, et de façon moins efficace l'élafine, pouvaient être liées de façon covalente sous l'action d'une TGase à de la fibronectine, du collagène IV, de la β -cristalline et du fibrinogène *in vitro* (Guyot *et al.*, 2005b). De plus, les inhibiteurs fixés par transglutamination à la fibronectine, par exemple, restent inhibiteurs de l'HNE et de la Pr3. Les inhibiteurs liés à la fibronectine présentent cependant des valeurs de K_i supérieures à celles obtenues avec les inhibiteurs solubles. En effet, la T2 fixée présente, par rapport à sa forme soluble, une valeur de K_i 10 fois supérieure pour l'HNE et 66 fois supérieure pour la Pr3. De même, l'élafine liée présente, par rapport à l'inhibiteur soluble, une valeur de K_i 4 fois supérieure pour l'HNE et 170 fois supérieure pour la Pr3. Une fois fixée à la fibronectine, il semblerait que l'élafine ne peut plus être libérée de la T2 par la tryptase (Guyot *et al.*, 2005b). Ces inhibiteurs liés aux protéines de la matrice extracellulaire pourraient servir de réservoirs locaux d'anti-HNE et d'anti-Pr3. Il est à noter que les orthologues de l'élafine chez le mouton, appelés TOM-1 et TOM-2 (*Trappin Ovine Molecule-1* et -2), possèdent 19 et 26 séquences substrats de TGase, respectivement, soulignant un intérêt de cette propriété d'ancrage (Brown *et al.*, 2004).

La présence de la Met en P'1, comme pour le SLPI et l' α 1-PI, rend ces deux inhibiteurs sensibles à l'oxydation. En effet, l'oxydation de cette Met entraîne une perte d'affinité pour l'HNE et la Pr3. En remplaçant ce résidu critique par une leucine (M25L/M63L), non oxydable, les inhibiteurs présentent une perte d'affinité pour l'HNE qu'ils soient oxydés ou non, mais n'inhibent plus la Pr3 (Nobar *et al.*, 2005). Une étude récente a montré qu'un autre mutant de la T2, le variant M63G, perdait également ses propriétés inhibitrices vis-à-vis de l'HNE et de la Pr3, ce qui suggère que cette Met est un résidu déterminant dans l'inhibition des NSPs (Doucet *et al.*, 2007).

Peu d'enzymes inactivent l'élafine et la T2. Des études réalisées au laboratoire ont montré que la T2 est sensible à la protéolyse dans le domaine cémentoïne, à la jonction des domaines cémentoïne et élafine et dans la partie C-terminale de l'élafine. Aucune des différentes familles d'enzymes testées dans ces expériences n'ont clivé l'inhibiteur dans la boucle réactive (Guyot *et al.*, 2005a). Seul l'antigène de la HDM (*House Dust Mite Dermatophagoides pteronyssinus* Derp1, constitué par deux protéases : une protéase à cystéine et une protéase à sérine, est capable d'inactiver l'élafine ainsi que l' α 1-PI mais pas le SLPI (Brown *et al.*, 2003).

E. Expression de la trappine-2

Le gène codant la T2 est exprimé de façon constitutive dans de nombreux épithélia qui sont continuellement en contact avec des facteurs pro-inflammatoires comme la peau, les poumons, la cavité buccale et vaginale (Nara *et al.*, 1994 ; Pfundt *et al.*, 1996 ; King *et al.*, 2003a, b, c et Vos *et al.*, 2005). Ce gène est exprimé de façon moins importante dans les tissus de l'appareil digestif (Nara *et al.*, 1994). Il est à noter que c'est au niveau de la peau et des poumons que les fibres d'élastine sont les plus abondantes. La T2 jouerait, comme le SLPI, un rôle important dans l'inhibition de la dégradation de l'élastine. En général, la production de T2 va être augmentée en réponse à des stimuli pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-1 β (Tanaka *et al.*, 2000 ; Pfundt *et al.*, 2000) ainsi qu'en réponse à *P. aeruginosa* (Vos *et al.*, 2005), le LPS (Meyer-Hoffert *et al.*, 2003) et l'HNE (Reid *et al.*, 1999 ; Sallenave *et al.*, 1994 ; van Wetering *et al.*, 2000b). En revanche, l'adénovirus EA1 diminue l'expression de l'élafine mais aussi du SLPI dans les cellules épithéliales alvéolaires et bronchiques (Higashimoto *et al.*, 2005). De même, l'oncoprotéine E6 de l'HPV-16 (*Human PapillomaVirus type 16*) diminue la production et la sécrétion de l'élafine, de la TGase et de l'involucrine par les kératinocytes lors d'une infection (Duffy *et al.*, 2003). Comme le gène codant pour le SLPI, le gène *PI3* est également exprimé dans les macrophages (Mihaila et Tremblay, 2001) et les neutrophiles, même si le SLPI semble être l'inhibiteur des NSPs le plus concentré (Sallenave *et al.*, 1997). Selon les types cellulaires testés, la production de la T2 ne sera pas régulée de la même façon. En effet, les études du promoteur du gène de la T2 dans différentes lignées épithéliales (mammaires, pulmonaires, peau) ont montré la présence de plusieurs séquences consensus de fixation de facteurs de transcription tels que AP-1 (Zhang *et al.*, 1995) et SP-1 (Zhang *et al.*, 1997), NF- κ B (Bingle *et al.*, 2001), NF-IL6 (Pol *et al.*, 2003), et C/EBP β (CCAAT/Enhancer Binding Protein beta) (Yokota *et al.*, 2007).

La concentration moyenne en élafine dans les sécrétions bronchiques de patients sains est comprise entre 1,5 et 4,5 μ M où cet inhibiteur représente environ 20% du potentiel inhibiteur (avec le SLPI et l' α 1-PI) dans les LLBA de patients sains (Tremblay *et al.*, 1996).

IV. Activités biologiques du SLPI, de l'élafine et de la trappine-2

La production de ces inhibiteurs par les cellules épithéliales et/ou de l'immunité est régulée par les stimuli pro-inflammatoires comme les produits bactériens et les cytokines. Ces inhibiteurs vont donc jouer un rôle important dans le contrôle et la modulation de la réaction

inflammatoire. En plus de leur capacité à inhiber les trois NSPs, ces inhibiteurs possèdent d'autres propriétés biologiques, que n'ont pas les autres inhibiteurs de protéases (Tableau X). Ces propriétés leur confèrent un rôle central dans l'organisation de la réponse immunitaire innée et spécifique.

SLPI	Elafine
Anti-protéase (HNE, CatG)	Anti-protéase (HNE, Pr3)
Antibactérienne	Antibactérienne
Anti-fongique	Anti-fongique
Anti-virale (HIV)	Anti-virale (HIV)
Anti-inflammatoire	Anti-inflammatoire
Dépendante de l'activité anti-protéase	Dépendante de l'activité anti-protéase
Indépendante de l'activité anti-protéase	Indépendante de l'activité anti-protéase
Régulation de l'immunité innée	Régulation de l'immunité innée
Régulation de l'immunité adaptative	Architecture tissulaire
Homéostasie tissulaire	Anti-cancéreuse?
Anti-cancéreuse?	

Tableau X : Propriétés biologiques du SLPI et de l'élafine. (D'après Williams *et al.*, 2006 ; Moreau *et al.*, 2008).

A. Les propriétés anti-inflammatoires

Le SLPI et la T2/élafine ont des activités anti-inflammatoires qui sont dépendantes ou indépendantes de leurs fonctions inhibitrices de protéases.

1. Activités anti-inflammatoires dépendantes de leurs fonctions inhibitrices

L'activité enzymatique des NSPs module la réaction inflammatoire. Les inhibiteurs de NSPs vont donc jouer un rôle important dans la régulation de l'inflammation. Le SLPI et l'élafine peuvent cibler les trois NSPs et vont ainsi limiter les effets délétères d'une activité protéolytique excessive. Ils vont inhiber la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire comme l'élastine (Lombard *et al.*, 2006), la laminine (Mydel *et al.*, 2008) et la fibronectine (Salcedo *et al.*, 1997), des récepteurs cellulaires (Hartl *et al.*, 2007) et peuvent limiter la libération de peptides chimioattractants pro-inflammatoires. Le SLPI va également pouvoir inhiber la libération et l'activation d'autres protéases, en particulier celle de la MMP2 et de la cathepsine B (Geraghty *et al.*, 2007a), diminuer la production de la cathepsine S et de la MMP-12 induite par l'IFN γ chez les macrophages (Geraghty *et al.*, 2007b) et limiter la

production des mucines 1, 2 et 5AC en inhibant l'HNE (Griffin *et al.*, 2007). Le SLPI peut augmenter la production, par les fibroblastes pulmonaires, d'HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), un facteur de croissance à activité anti-inflammatoire. De même, Ashcroft *et al.* ont montré que le SLPI jouait un rôle important dans la cicatrisation en contrôlant la production de cytokines pro-inflammatoires comme le TGF- β (Ashcroft *et al.*, 2000). Une étude similaire a confirmé ce rôle central du SLPI dans le processus de cicatrisation (Angelov *et al.*, 2004). En inhibant la dégradation de la pro-épithéline (progranuline) en épithéline par l'élastase, le SLPI contrôle le processus de cicatrisation et l'activation de l'immunité innée. En effet, la pro-épithéline possède des activités anti-inflammatoires comme l'inhibition de l'activation par le TNF- α des neutrophiles. En revanche, l'épithéline présente des activités pro-inflammatoires comme l'induction de la production d'IL-8 par les cellules épithéliales, favorisant le recrutement des neutrophiles, la libération de protéases et d'oxydants (Zhu *et al.*, 2002). Une étude récente a confirmé ces observations. En effet, Kessenbrock *et al.* ont montré que la Pr3 et l'élastase murines pouvaient cliver la progranuline et ainsi diminuer la concentration de cette molécule anti-inflammatoire localement, favorisant une réponse inflammatoire par les neutrophiles (Kessenbrock *et al.*, 2008). De même, la Pr3 clive spécifiquement l'annexine A1, une molécule à activité anti-inflammatoire qui inhibe l'interaction des leucocytes avec les cellules endothéliales activées (Vong *et al.*, 2007).

Le rôle central du SLPI dans la réaction inflammatoire a été confirmé par Schneeberger *et al.* dans un modèle d'ischémie/reperfusion après une greffe cardiaque chez le rat. En effet, le SLPI va diminuer l'activité pro-inflammatoire des protéases et limiter la production de TGF- β (Schneeberger *et al.*, 2008). Une étude précédente a montré que le SLPI augmentait la production de TGF- β et d'IL-10 par des macrophages activés par le LPS (Sano *et al.*, 2000). Bien que ces deux cytokines n'aient pas les mêmes fonctions, le SLPI semble les réguler de la même façon. Le SLPI maintient l'intégrité du système immunitaire. Jacobsen *et al.* ont montré que le SLPI est co-libéré avec la lactoferrine par les neutrophiles activés. Le SLPI protégerait ce peptide antimicrobien, dans les granules et après exocytose, de la dégradation par des protéases (Jacobsen *et al.*, 2008). De même l'élafine protège le CD14 membranaire à la surface des macrophages de la protéolyse par l'HNE. Le CD14 est le facteur de reconnaissance des cellules apoptotiques. L'intégrité du CD14 permet la reconnaissance et l'élimination des cellules apoptotiques, nécessaires à la résolution de l'inflammation (Henriksen *et al.*, 2004).

2. Activités anti-inflammatoires indépendantes de leurs fonctions inhibitrices

Différentes études ont montré que le SLPI et l'élafine présentaient des activités anti-inflammatoires indépendantes de leurs activités inhibitrices dans différentes pathologies comme l'athérosclérose et l'emphysème pulmonaire (Henriksen et Sallenave, 2008 ; Janelle *et al.*, 2006 ; Williams *et al.*, 2006). Le SLPI diminue la production de médiateurs pro-inflammatoires comme les PGE2 et les MMPs par les monocytes en interférant dans la cascade de signalisation intracellulaire (Zhang *et al.*, 1997b). Dans un modèle d'arthrite induite chez le rat, le SLPI diminue la production de TNF- α et l'activation du NF- κ B (Song *et al.*, 1999). Lentsch *et al.* ont montré que le SLPI prévenait l'activation du NF- κ B, diminuant ainsi la production de molécules pro-inflammatoires comme l'IL-8. La diminution de l'activité du NF- κ B est à corréluer avec l'augmentation de la synthèse du I κ B β , un important régulateur du NF- κ B (Lentsch *et al.*, 1999). Quelques années plus tard, Taggart *et al.* ont confirmé et précisé ces résultats (Taggart *et al.*, 2005). Ils ont montré qu'en incubant des monocytes circulants purifiés ou la lignée monocyttaire U937 avec du SLPI, ce dernier était très rapidement endocyté et localisé dans le cytoplasme et le noyau. Dans le cytoplasme, il empêche la dégradation des facteurs de régulation du NF- κ B comme le I κ B β , le I κ B α et l'IRAK, par le système ubiquitine-protéasome lorsque les cellules sont activées par du LPS ou du LTA (Greene *et al.*, 2004 et Taggart *et al.*, 2002). Le SLPI inhibe la dégradation des protéines I κ B, leurs permettant ainsi de rester complexées au NF- κ B et d'inhiber son entrée dans le noyau. Dans le noyau, c'est une autre propriété du SLPI qui va intervenir. Il va interférer dans la cascade d'activation du NF- κ B. Il va entrer en compétition avec la sous-unité p65 pour la fixation sur le promoteur des gènes codant pour des molécules pro-inflammatoires comme l'IL-8 et le TNF- α et ainsi bloquer leur transcription (Taggart *et al.*, 2005). Le rôle de l'activité inhibitrice de protéases du SLPI dans ces activités anti-inflammatoires est ambigu. En effet, des mutants atténués du SLPI ou le SLPI oxydé ne peuvent pas empêcher la dégradation des protéines I κ B β / α (Taggart *et al.*, 2002 et Mulligan *et al.*, 2000).

L'élafine présente les mêmes propriétés anti-inflammatoires que le SLPI. L'élafine inhibe l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 dans les cellules de la lignée monocyttaire U937 activées par du LPS. L'inactivation des facteurs de transcription passe par un effet inhibiteur de l'élafine sur le système ubiquitine-protéasome (Butler *et al.*, 2006). Des résultats similaires ont également été décrits sur les propriétés anti-inflammatoires du SLPI et de l'élafine, dans deux études différentes (Sallenave *et al.*, 2003 et Hendriksen *et al.*, 2004a).

De plus, le SLPI et l'élafine/T2 peuvent se lier au LPS (Ding *et al.*, 1999 et McMichael *et al.*, 2005b). Les complexes SLPI-LPS inhibent la réponse pro-inflammatoire des macrophages au LPS, en limitant l'internalisation des complexes LPS-CD14 (Ding *et al.*, 1999). La même équipe a montré qu'une forme non sécrétée du SLPI contrôlait également la réponse pro-inflammatoire des macrophages vis-à-vis du LPS (Zhu *et al.*, 1999). L'élafine et la T2 jouent également le rôle d'antagoniste des effets du LPS. Selon les conditions du milieu extracellulaire, ces deux inhibiteurs peuvent jouer un rôle de protéine liant le LPS comme la LBP (*LPS-Binding Protein*) et avoir des effets pro-inflammatoires en activant la réponse immunitaire innée (McMichael *et al.*, 2005b).

En 2003, Nakamura *et al.* ont montré que les souris déficientes en SLPI sont plus sensibles au LPS que les souris sauvages. Les macrophages SLPI^{-/-} produisent et libèrent plus d'IL-6, de HMG-1 (*High-Mobility Group-1*) et présentent une activité du NF-κB supérieure par rapport à celle des macrophages des souris sauvages. De plus, les LB SLPI^{-/-} prolifèrent plus vite et produisent plus d'IgM que les lymphocytes B des souris sauvages. Ces expériences impliquent le SLPI dans la régulation de la réponse inflammatoire en réponse au LPS (Nakamura *et al.*, 2003). Le SLPI joue également un rôle dans la réponse des cellules dendritiques aux faibles doses de LPS. Il sert de régulateur de la réponse inflammatoire et induit la tolérance aux faibles concentrations d'antigènes bactériens (Samson *et al.*, 2007). Une étude récente montre que le SLPI agit au niveau de la transition de la défense immunitaire innée à l'activation de la réponse immunitaire adaptative. En effet, le SLPI régule le passage de la production des IgA aux IgG dans les lymphocytes B (Xu *et al.*, 2007).

Bien que ces inhibiteurs aient été premièrement décrits comme des inhibiteurs des NSPs, il est clair aujourd'hui qu'ils présentent également des propriétés anti-inflammatoires indépendantes de leur fonction inhibitrice.

B. Les propriétés anti-microbiennes

1. Les propriétés anti-bactériennes

Le SLPI et l'élafine/T2 possèdent des activités anti-bactériennes contre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif, leur conférant ainsi un rôle supplémentaire dans la défense des muqueuses. Le SLPI est actif contre *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *S. epidermidis* (Hiemstra *et al.*, 1996 et Wiedow *et al.*, 1998) alors que l'élafine est active contre *P. aeruginosa* et *S. aureus* (Simpson *et al.*, 1999 ; Simpson *et al.*, 2001 et Meyer-Hoffert *et al.*,

2003) mais pas contre *E. coli* (Meyer-Hoffert *et al.*, 2003). L'activité anti-bactérienne du SLPI dépend de sa concentration. Le domaine 1 (non inhibiteur mais plus cationique que le domaine 2) est le plus actif. Mais l'activité des deux domaines séparés ou l'association des deux sont moins efficaces que le SLPI natif contre *E. coli* et *S. aureus* (Hiemstra *et al.*, 1996). Comme pour le SLPI, l'activité anti-bactérienne de l'élafine et de la T2 semble être indépendante de l'activité inhibitrice. En effet, les domaines cémentoïne et élafine présentent une activité anti-bactérienne contre *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Comme pour le SLPI, la T2 native est plus efficace que les domaines séparés (Simpson *et al.*, 1999). Ces résultats *in vitro* ont été confirmés *in vivo* par des travaux montrant que la surexpression de l'élafine au niveau pulmonaire chez des souris améliore la défense anti-bactérienne contre *P. aeruginosa* et *S. aureus*, ainsi que le contrôle de l'inflammation en réponse aux pathogènes (Simpson *et al.*, 2001 et McMichael *et al.*, 2005a). En 2008, Bellemare *et al.* ont observé que la T2 sauvage est plus active qu'un mutant atténué (M25G, numérotation élafine) pour inhiber la croissance de *P. aeruginosa* ATCC 33348. Cette activité serait due à l'inhibition d'une protéase sécrétée par cette souche dans le milieu, l'arginyl peptidase ou protéase IV. La T2 sauvage semble être moins active vis-à-vis de souches ne sécrétant pas cette enzyme comme la souche de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Bellemare *et al.*, 2008). King *et al.* ont montré que le SLPI et l'élafine étaient produits par l'endomètre. Comme les défensines β 1 à 4, ils vont être différemment régulés durant le cycle menstruel afin de prévenir des infections utérines (King *et al.*, 2003a, b, c). De plus, en réponse à *P. aeruginosa*, les kératinocytes (Meyer-Hoffert *et al.*, 2003) et les cellules épithéliales pulmonaires (Vos *et al.*, 2005) produisent et sécrètent du SLPI et de l'élafine. Ces expériences confirment le rôle de ces inhibiteurs dans la défense anti-bactérienne, en plus des autres peptides cationiques tels que les défensines et la LL-37.

A ce jour, parmi toutes les protéines à domaine WAP décrites, seules trois protéines sont des inhibiteurs de protéases : le SLPI, l'élafine et la caltrine II. La caltrine II qui est un inhibiteur des transporteurs de calcium, inhibe l'HNE (Furutani *et al.*, 2004). En revanche, la plupart des protéines à domaine WAP comme l'éppine (EPPIN : *EPididymal Proteinase INhibitor*) (Yenugu *et al.*, 2004), SWAM1 (*Single WAP Motif Protein 1*) et SWAM2 chez la souris (Hagiwara *et al.*, 2003) et l'omwaprine isolée de venin du serpent de feu (*Oxyuranus microlepidotus*) (Nair *et al.*, 2007) possèdent des activités anti-bactériennes. Ces activités anti-bactériennes vont être spécifiques à chaque protéine puisque l'éppine n'est active que contre les bactéries à Gram négatif, l'omwaprine seulement sur les bactéries à Gram positif et SWAM1 et SWAM2 sur les bactéries à Gram négatif et positif.

2. Les propriétés anti-fongiques

Le SLPI possède également des propriétés anti-fongiques (Tomee *et al.*, 1997). En effet, le SLPI est actif contre les pathogènes *C. albicans* et *A. fumigatus* aux mêmes concentrations que le lysozyme et les défensines. Comme pour l'activité anti-bactérienne, le domaine 1 semble être le plus actif bien que le SLPI natif présente un effet maximal. Ces propriétés anti-microbiennes confèrent au SLPI une fonction importante dans l'immunité des muqueuses. En ce qui concerne l'élafine et la T2, nous avons montré que ces inhibiteurs possédaient également des activités anti-fongiques (Baranger *et al.*, 2008). Ces résultats seront présentés et discutés dans la partie travaux personnels de cette thèse. A ce jour, parmi les protéines à domaine WAP, seules les propriétés anti-fongiques de l'élafine/T2 et du SLPI ont été décrites.

Le mécanisme d'action de ces inhibiteurs semble provenir de leur caractère cationique. Un parallèle peut être établi entre les peptides cationiques antibactériens professionnels comme les défensines et ces deux inhibiteurs. Les premiers vont être capables de déstabiliser les membranes bactériennes, chargées négativement (Peschel et Sahl, 2006 ; Yeaman et Yount, 2007). D'après les potentiels électrostatiques de surface du SLPI et de l'élafine, les clusters d'acides aminés chargés sont répartis différemment, ce qui pourrait expliquer les différences dans les activités anti-microbiennes (Figure 24) (Moreau *et al.*, 2008). L'implication des charges positives dans l'activité anti-microbienne du SLPI a été confirmée par Nishimura *et al.* (Nishimura *et al.*, 2008). Ils ont en effet montré que le SLPI murin présente une activité vis-à-vis de *Mycobacterium bovis* et de *Mycobacterium tuberculosis*. Cette activité anti-mycobactérienne est observée à de très faibles concentrations en SLPI (<1µM), concentrations auxquelles le SLPI n'est pas actif vis-à-vis de *Salmonella typhimurium*. Le SLPI s'associe aux membranes des mycobactéries, aboutissant à un changement de structure de la membrane extérieure et à sa perméabilisation au bout de 12 heures. Les deux domaines WAP sont actifs, seulement deux résidus chargés positivement de chaque domaine, compris entre la première et la troisième cystéine, sont impliqués dans cette activité comme le montrent les résultats obtenus par mutagénèse dirigée des résidus K et R en D dans les deux domaines séparés (Nishimura *et al.*, 2008).

3. Les propriétés anti-virales

Le SLPI et l'élafine possèdent des activités anti-virales importantes (Bingle et Vyakarnam, 2008). L'analyse du potentiel anti-viral de la salive a montré que le SLPI représente le facteur le plus spécifique et efficace contre les infections au HIV-1. Le SLPI est actif à concentration physiologique ce qui en fait un acteur majoritaire dans la lutte anti-HIV-1 (McNeely *et al.*, 1997 ; Wahl *et al.*, 1997). Bien que le mécanisme d'action ne soit pas encore très clair, il semblerait que le SLPI n'interagirait pas directement avec le virus mais avec les cellules cibles du virus. Une protéine membranaire, la scramblase, qui intervient dans les mouvements des phospholipides membranaires, peut lier le SLPI. La formation du complexe SLPI-scramblase empêcherait la fusion du virus avec la membrane cellulaire (Tseng et Tseng, 2000). Le SLPI peut également se lier à l'annexine II, une protéine membranaire des macrophages pouvant lier les phospholipides, impliquée dans l'interaction avec les phosphatidylsérines de l'enveloppe virale. Cette interaction est nécessaire pour l'infection des monocytes. Le SLPI interfère dans cette liaison et empêche l'infection (Ma *et al.*, 2004). Une étude a montré que les concentrations élevées du SLPI dans les sécrétions vaginales étaient associées à la réduction du taux de transmission du virus HIV-1 aux foetus chez les femmes enceintes (Pillay *et al.*, 2001).

En ce qui concerne l'activité anti-HIV-1 de l'élafine, aucune donnée n'a encore été publiée mais un groupe canadien a déposé un brevet en 2006 (Ball *et al.*, 2006). L'élafine (6007 Da) et non pas la T2 a été identifiée, par spectrométrie de masse SELDI-TOF, comme marqueur de résistance au HIV-1 dans les sécrétions vaginales dans une population de prostituées kényanes. Il semblerait que l'élafine empêcherait l'infection par ce virus des lymphocytes T *in vitro*. Bien que l'intitulé du brevet parle de T2, seule l'élafine a été testée dans ces expériences.

C. Le SLPI, l'élafine et cancers

Bien que les études concernant l'implication des protéines à domaines WAP dans les cancers soient récentes, les premiers résultats montrent que certaines protéines comme le SLPI et l'élafine sont différemment modulées selon les tissus touchés, le type et le stade de développement du cancer. Ces inhibiteurs ont été proposés comme marqueurs biologiques de pathologies mais leur rôle dans le cancer reste encore à préciser (Bouchard *et al.*, 2006).

En 1996, Koshikawa *et al.* ont montré que les cellules de glioblastome de la lignée T98G en culture sécrétaient du SLPI, suggérant ainsi un rôle de cet inhibiteur dans la croissance des cellules cancéreuses (Koshikawa *et al.*, 1996). Le SLPI est surexprimé dans tous les types de cancer des ovaires et sa concentration pourrait permettre de distinguer un cancer malin d'un cancer bénin, ainsi que son stade de développement (Hough *et al.*, 2001 ; Tsukishiro *et al.*, 2005). De même, les patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules ont un taux plus élevé de SLPI dans leurs séra et dans leurs tissus tumoraux que les patients atteints d'un cancer des poumons à petites cellules (Ameshima *et al.*, 2000). Le SLPI et l'élafine sont surexprimés dans les cancers pulmonaires épidermoïdes des voies aériennes supérieures, en particulier lorsque les cellules sont moyennement et bien différenciées (Westin *et al.*, 2002 ; Yoshida *et al.*, 2002). Il a également été montré que le SLPI murin ou humain transfecté dans des cellules Lewis Lung Carcinoma 3LL-S augmente leurs pouvoirs tumorigéniques et métastatiques et que cette activité est dépendante de la fonction inhibitrice de protéase. Ces cellules transfectées acquièrent le même phénotype que les cellules 3LL-S-sc, cellules cancéreuses malignes (Devoogdt *et al.*, 2003). En 2006, Devoogdt *et al.* ont montré que l'effet activateur de la tumorigénèse du TNF- α passait par l'induction de la production du SLPI (Devoogdt *et al.*, 2006). D'autres inhibiteurs des NSPs comme l' α 1-Pi et l'ACT, sont également surexprimés dans les cancers du poumon (Zelvyte *et al.*, 2004 ; Nukiwa *et al.*, 2008) impliquant ainsi les différentes protéases à sérine dans la progression des cancers. La fonction précise du SLPI dans la progression des cancers n'est pas encore claire aujourd'hui car des effets pro et anti-cancéreux ont été décrits. Chez les patients atteints d'un cancer de la prostate, le SLPI est fortement diminué par rapport aux patients sains, ce qui en fait un bon marqueur biologique (Thompson *et al.*, 2008). La surexpression du SLPI dans la lignée murine de cancer mammaire MCH66 augmente la croissance tumorale et le pouvoir métastatique mais diminue le pouvoir invasif de ces cellules *in vitro* (Sugino *et al.*, 2007). En revanche, la surexpression du SLPI dans une lignée cancéreuse du foie (H-59) décroît son pouvoir métastatique en diminuant la synthèse de molécules pro-inflammatoires comme le TNF- α (Wang *et al.*, 2006). Une étude récente a montré que le SLPI est surexprimé par les cellules gastriques cancéreuses. Son expression est d'autant plus importante que le cancer est avancé. De plus, il augmenterait le pouvoir invasif de cellules AZ521 transfectées (Cheng *et al.*, 2008). Deux études récentes ont décrit des effets inverses du SLPI dans le cadre d'un cancer des ovaires. Le SLPI peut inhiber la croissance des cellules tumorales en induisant la mort de ces cellules par apoptose (Nakamura *et al.*, 2008). A l'inverse, la surexpression du SLPI peut créer un environnement pro-tumoral en inhibant la dégradation de la progranuline

par l'HNE. La progranuline est un facteur de prolifération et de survie des cellules cancéreuses (Simpkins *et al.*, 2008).

Comme pour le SLPI, l'implication de l'élafine dans les cancers est ambiguë. L'élafine est surexprimée par les cellules tumorales de l'épiderme et son expression est d'autant plus importante que le stade du cancer est avancé (Alkemade *et al.*, 1993 ; Alkemade *et al.*, 1994). L'expression de l'élafine dans les cancers avancés est à corrélérer avec l'expression de l'élastase par ces mêmes cellules épithéliales. Il a donc été suggéré que l'élafine aurait un rôle protecteur, diminuant ainsi le pouvoir métastatique de ces cellules tumorales en inhibant l'élastase (Alkemade *et al.*, 1994). Il a été montré que l'élafine pouvait limiter la progression du cycle cellulaire dans des cellules cancéreuses mammaires (Zhang *et al.*, 1995) mais aussi induire la mort cellulaire par apoptose dans des cellules épithéliales cancéreuses de l'œsophage (Yamamoto *et al.*, 1997). Une étude récente a indiqué que dans des cellules de cancer du sein, prélevées chez des patientes, la production d'élafine, qui est fortement diminuée, est associée avec une forte activité protéolytique favorisant ainsi le processus d'invasion tumoral (Yokota *et al.*, 2007). Saidi *et al.* ont montré que l'élafine pouvait être un marqueur biologique de l'agressivité des glioblastomes et une cible thérapeutique dans cette pathologie (Saidi *et al.*, 2008). Des études sont encore nécessaires pour déterminer l'implication de ces inhibiteurs dans les différents cancers.

V. Les inhibiteurs synthétiques

Compte tenu de l'implication des NSPs dans les pathologies inflammatoires, de nombreuses équipes et firmes pharmaceutiques se sont intéressées à la caractérisation et au développement d'inhibiteurs, en particulier des inhibiteurs d'HNE. Dans cette course aux inhibiteurs, beaucoup d'études ont été réalisées sur les inhibiteurs naturels purifiés à partir de plantes. Siedle *et al.* ont décrit tous ces inhibiteurs d'élastase naturels connus comme les flavonoïdes, les tannins, les terpènes et les oses. A ce jour, aucun de ces inhibiteurs naturels n'est arrivé en phase de commercialisation (Siedle *et al.*, 2007). La structure de ces inhibiteurs naturels sert souvent de base pour la synthèse d'inhibiteurs dérivés semi-synthétiques ou d'inhibiteurs synthétiques.

La plupart des inhibiteurs d'HNE commercialisés sont des inhibiteurs synthétiques non protéiques. Le seul inhibiteur protéique commercialisé est l' α 1-PI (Prolastin). Parmi les inhibiteurs synthétiques, certains sont déjà utilisés en clinique comme par exemple le Sivelestat (ONO-5046/Elaspol), d'autres sont en cours de développement comme le

Midesteine (MR-889) et le GW-311616. Mais de nombreux autres inhibiteurs ont été abandonnés pendant les tests en phase clinique comme le FR-136706 et l'ONO-6818 (Tremblay *et al.*, 2003).

Le Sivelestat (ONO-5046) est un inhibiteur compétitif spécifique de l'HNE de 434 Da ($IC_{50}=0,044 \mu M$ et $K_i=0,2 \mu M$). Cet inhibiteur inhibe également l'élastase de neutrophile de lapin, de rat, de hamster et de souris. En revanche, il n'inhibe pas la trypsine, la thrombine, la plasmine, la chymotrypsine et la CatG (Kawabata *et al.*, 1991). L'efficacité anti-inflammatoire du Sivelestat a été démontrée dans différents modèles animaux de pathologies pulmonaires (Kawabata *et al.*, 1991 ; Sakamaki *et al.*, 1996 ; Miyazaki *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 1999 ; Iba *et al.*, 2006 ; Toda *et al.*, 2007 ; Shimbo *et al.*, 2007). Les propriétés anti-inflammatoires du Sivelestat ne sont pas seulement dues à l'inhibition de l'HNE mais aussi à la diminution de l'expression de facteurs pro-inflammatoires comme la MPO et le NF- κ B (Tremblay *et al.*, 2003 ; Toda *et al.*, 2007). Parmi les inhibiteurs synthétiques d'HNE, le Sivelestat est le seul autorisé sur le marché. Il est testé dans le cadre de différentes pathologies inflammatoires pulmonaires comme le SDRA (Hashimoto *et al.*, 2008).

Le Midesteine (MR889) est un inhibiteur réversible de l'HNE et de la PPE (Baici *et al.*, 1990). Cet inhibiteur a la particularité d'inhiber l'activité enzymatique résiduelle de l'HNE lorsque celle-ci est piégée par l' α 2M (Luisetti *et al.*, 1989). En dépit de sa faible affinité pour l'HNE ($K_i=1,38 \mu M$), cet inhibiteur n'est pas toxique et inhibe de nombreuses protéases élastinolytiques, ce qui en fait un candidat idéal pour le traitement de pathologies pulmonaires inflammatoires. De plus, il a la propriété de diminuer la viscosité du mucus pulmonaire, propriété intéressante dans le cadre du traitement de la mucoviscidose (Moretti *et al.*, 1994). Il a été testé chez des patients atteints de BPCO, mais les résultats obtenus restent à compléter (Luisetti *et al.*, 1996 ; Ohbayashi, 2002).

L'AE-3763 est un inhibiteur spécifique de l'HNE avec un $K_i=3,2 \text{ nM}$. Il possède, comme les autres inhibiteurs d'HNE, la propriété de réduire les lésions pulmonaires induites par l'HNE et l'inflammation induite par le LPS (Ohbayashi, 2002 ; Tremblay *et al.*, 2003).

VI. Autres facteurs de régulation de l'activité protéolytique des protéases à sérine de neutrophiles.

En plus des inhibiteurs endogènes comme l' α 1-PI, le SLPI et l'élafine, les activités protéolytiques des NSPs peuvent être régulées par différentes molécules comme des

inhibiteurs d'origine bactérienne et fongique, par les polyanions (ADN, glycosaminoglycanes) ou par des processus oxydatifs.

A. Les inhibiteurs d'origine microbienne

Les NSPs participent à la lutte anti-microbienne. En réponse à cet arsenal protéolytique, les microorganismes ont développé des moyens de défense que sont les inhibiteurs. L'écotine est le seul inhibiteur de protéases à sérine produit par *E. coli*. C'est un homodimère de 32 kDa qui n'est pas sécrété dans le milieu extracellulaire. Cet inhibiteur est situé dans le périplasme, entre la membrane plasmique et la membrane externe. C'est un puissant inhibiteur de trypsine et de chymotrypsine mais également de l'HNE avec un K_i d'environ 12 pM. Il existe des homologues de l'écotine chez d'autres bactéries comme *P. aeruginosa* et *Yersinia pestis* qui inhibent également l'HNE avec des K_i de 16 pM et $5 \cdot 10^{-12}$ M respectivement. Ces trois inhibiteurs inhibent de la même façon la CatG ($K_i < 5 \cdot 10^{-12}$ M). Une autre écotine a été décrite chez un pathogène de plantes, *Pantoea citrea*. Cet inhibiteur est beaucoup moins efficace pour inhiber l'HNE mais inhibe aussi bien la CatG, la trypsine et la chymotrypsine (Eggers *et al.*, 2004). L'HNE est essentielle pour l'élimination efficace des bactéries à Gram négatif (Belaouaj *et al.*, 1998). En effet, l'HNE dégrade une protéine à la surface de la membrane externe, la protéine OmpA, protéine importante pour le maintien de la structure de cette membrane et la viabilité des bactéries. L'écotine protégerait spécifiquement les bactéries de l'activité protéolytique de l'HNE dans le périplasme, qui conduit à la mort de celles-ci (Eggers *et al.*, 2004).

D'autres microorganismes, comme les *Aspergillus*, sont capables de sécréter des inhibiteurs des NSPs. Les *Aspergillus*, en particulier *A. fumigatus*, sont des pathogènes opportunistes qui vont infecter les poumons et causer des aspergilloses pulmonaires. Ces maladies se développent généralement à la suite d'autres pathologies chroniques du poumon, comme des complications de l'[asthme](#), la [mucoviscidose](#) ou chez les patients immunodéprimés (Latgé, 1999). Des inhibiteurs d'HNE, produits par deux souches d'*Aspergillus* : *A. flavus* et *A. fumigatus*, ont été purifiés et caractérisés. Ce sont de petits inhibiteurs protéiques d'environ 7,5 kDa, sécrétés dans le milieu extracellulaire, qui inhibent leurs « élastases » respectives et moins efficacement la PPE (Okumura *et al.*, 2004). La production d'inhibiteurs d'HNE par ces souches, en particulier par *A. fumigatus*, est à corréler avec le fait que les souris KO pour la mNE, sont plus sensibles aux infections par *A. fumigatus*, ce qui suggère que l'HNE doit jouer un rôle important dans la défense anti-

fungique (Tkalcevic *et al.*, 2000). Les microorganismes ont développé des inhibiteurs afin de contrer les défenses immunitaires de l'hôte, en particulier l'HNE.

B. L'oxydation

Les oxydants font partie des molécules intervenant dans la réponse immunitaire innée. Comme les protéases, ils peuvent devenir délétères s'ils ne sont pas contrôlés lors de la réaction inflammatoire. Ils peuvent causer des dommages tissulaires importants. Plusieurs types d'oxydants comme l'HClO et l'H₂O₂, sont produits par les neutrophiles pour lutter contre les infections.

L'HClO est généré à partir de l'H₂O₂ par la MPO. Les NSPs sont sensibles à l'HClO *in vitro*. En effet, l'oxydation des protéases va entraîner leur dégradation par autoprotéolyse (Hirche *et al.*, 2005). L'étude de ce mécanisme a été réalisée avec la CatG (Shao *et al.*, 2005). En présence d'HClO, la Met110 de la CatG va être oxydée en méthionine sulfoxyde. Cette méthionine est proche de l'Asp108, résidu impliqué dans la triade catalytique de l'enzyme (His64-Asp108-Ser201). L'oxydation de cette Met110 est à l'origine de l'inactivation de la CatG par deux voies distinctes. La première, due à un court-circuit lors du transfert de charge entre les résidus de la triade catalytique, durant le clivage du substrat. La seconde, due à l'introduction d'un site de clivage entraînant une autoprotéolyse et libérant ainsi un peptide contenant l'Asp108 (Shao *et al.*, 2005). Contrairement à l'HClO, l'H₂O₂ ne semble pas avoir d'effet sur l'activité des trois NSPs.

L'HClO inactive de façon dose-dépendante l'HNE et la CatG (Hirche *et al.*, 2005 ; Shao *et al.*, 2005). L'activité régulatrice de l'HClO a été également montrée *in vivo*. Dans ces travaux, Hirche *et al.* ont montré que des souris MPO^{-/-}, infectées par *K. pneumoniae*, ont une activité mNE plus importante que les souris sauvages infectées dans les mêmes conditions (Hirche *et al.*, 2005).

Le rôle protecteur (antimicrobien, inactivation des NSPs) et/ou délétère (inactivation des inhibiteurs, destruction des tissus environnants) des oxydants dans les réactions inflammatoires reste encore à démontrer.

C. Les polyanions

La CatG, l'HNE et la Pr3 sont des protéases chargées positivement à pH physiologique. Cette caractéristique physico-chimique favorise leurs interactions avec des

molécules chargées négativement comme les acides nucléiques et les carbohydrates anioniques, présents dans le contexte inflammatoire pulmonaire. Les carbohydrates anioniques sont présents dans les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes ainsi que dans certaines glycoprotéines. L'inhibition réversible et non compétitive des protéases par ces molécules résulte d'une interaction directe entre les deux molécules par des liaisons électrostatiques. Contrairement aux serpins et aux inhibiteurs canoniques qui sont des inhibiteurs compétitifs, les polyanions n'obstruent pas entièrement le site actif des protéases qui restent potentiellement actives et accessibles aux inhibiteurs.

1. Les acides nucléiques

Il a été démontré par Duranton *et al.* que l'ADN est capable d'inhiber l'HNE et la CatG mais pas la Pr3 (Duranton *et al.*, 2000a). On retrouve de l'ADN au niveau pulmonaire, dans des expectorations de patients atteints de bronchiectasie, d'asthme, de bronchite chronique et de mucoviscidose. La présence d'ADN dans les voies pulmonaires serait due à la lyse massive des neutrophiles (nécrose) après recrutement et activation au site de l'inflammation mais peut également provenir de la production des NETs par ces mêmes cellules (Brinkmann *et al.*, 2004). De petits fragments d'ADN (<0,5 kb) libérés en présence de DNase, sont inhibiteurs de la CatG et de l'HNE. Il est à noter que l'ADN inhibe de façon plus efficace la CatG, qui est la plus cationique des trois NSPs, puis l'HNE. L'utilisation de DNase chez les patients atteints de mucoviscidose n'entraîne pas la libération d'activité due à l'HNE et due à la CatG, ce qui fait de la Pr3 la protéase pouvant jouer un rôle important dans cette pathologie (Duranton *et al.*, 2000a). La présence d'ADN pourrait constituer une barrière de défense supplémentaire pour contrôler les effets délétères des protéases. A l'inverse, cet effet protecteur peut être levé en présence de DNase (Balloy *et al.*, 2003). L'interaction ADN-protéases semble fortement diminuer l'efficacité des inhibiteurs endogènes comme l' α 1-PI et le SLPI vis-à-vis de l'HNE en diminuant leur affinité pour l'enzyme (Belorgey *et al.*, 1998). De même, Duranton *et al.* ont montré que des fragments d'ADN de 30 pb étaient capables d'inhiber faiblement la CatG et de diminuer fortement l'affinité de l'ACT et de l' α 1-PI pour l'enzyme complexée à ces fragments d'ADN. En revanche, l'affinité du SLPI pour le complexe CatG-ADN ne semble pas être modifiée (Duranton *et al.*, 2000b). De plus, Ying *et al.* ont montré que l'association du SLPI natif et oxydé avec l'HNE était facilitée en présence d'ADN (Ying *et al.*, 2000).

2. Les glycosaminoglycanes, protéoglycanes et glycoprotéines

Les glycosaminoglycanes (GAG s) et les protéoglycanes sont des éléments constitutifs de la matrice extracellulaire. Les GAGs sont formés par de longues chaînes polysaccharidiques non ramifiées faites de répétition d'un motif disaccharidique. Parmi les GAGs, l'héparine et l'héparane sulfate ont été décrits comme pouvant inhiber les NSPs. Le caractère anionique de ces molécules, dû notamment aux nombreux groupements carboxyliques et sulfates qui les composent, serait impliqué dans cette capacité à inhiber les enzymes. L'héparine est un inhibiteur réversible et compétitif de l'HNE et de la CatG (Baici *et al.*, 1993). De plus, les complexes enzyme-héparine sont moins sensibles à l'inhibition par l' α 1-PI et l'ACT (Frommherz *et al.*, 1991 ; Faller *et al.*, 1992 ; Ermolieff *et al.*, 1994). En revanche, il a été montré par Ermolieff *et al.* que la CatG et l'HNE étaient plus vite inhibées par le SLPI lorsque celui-ci est complexé avec de l'héparine et en particulier de l'héparine O-butyrylée (Ermolieff *et al.*, 1998). Le SLPI est sensible aux phénomènes oxydatifs de par la présence de la Met73 en P'1. Le SLPI oxydé perd de l'affinité pour l'HNE et la CatG mais cette perte d'affinité peut être inversée lorsque le SLPI oxydé est associé à de l'héparine (Boudier *et al.*, 1999). De ce fait, l'héparine pourrait être un adjuvant potentiel lors d'une éventuelle utilisation du SLPI dans le traitement de pathologies pulmonaires. L'héparine peut également avoir un rôle dans l'activation des enzymes. Jordan *et al.* ont montré que l'HNE était capable de cliver l'anti-thrombine uniquement lorsque ce dernier est complexé avec son cofacteur, l'héparine. L'HNE se fixerait d'abord sur l'héparine avant de dégrader l'inhibiteur (Jordan *et al.*, 1987 ; Jordan *et al.*, 1989).

Comme les GAGs, les protéoglycanes peuvent également moduler l'activité des NSPs. Ce sont des molécules possédant une partie protéique sur laquelle viennent se fixer des GAGs. Les protéoglycanes, par l'intermédiaire de leurs GAGs, peuvent fixer les cytokines et les facteurs de croissance et ainsi moduler leur biodisponibilité. De la même façon, ils peuvent fixer les NSPs et ainsi les inhiber. Lors d'une réaction inflammatoire, la partie extracellulaire des protéoglycanes peut être clivée soit au niveau du corps protéique, soit au niveau des GAGs. Ainsi dans les sécrétions de patients atteints de bronchiectasies, l'HNE est associée au syndecan-1 qui est un protéoglycane membranaire constitué d'héparane sulfate (Chan *et al.*, 2003). Ce protéoglycane réduit l'activité enzymatique de l'HNE et de la CatG, et diminue l'interaction de ces enzymes avec leurs inhibiteurs : l' α 1-PI et l'ACT (Kainulainen *et al.*,

1998). Comme pour l'ADN, l'interaction enzyme-syndecan-1 ne modifie peu ou pas l'efficacité du SLPI vis-à-vis de l'HNE complexée (Chan *et al.*, 2003).

Comme les protéoglycanes par l'intermédiaire de leurs GAGs, les glycoprotéines (protéines glycosylées) peuvent également inhiber les NSPs. L'HNE est inhibée par les mucines, qui sont des glycoprotéines sécrétées par les cellules épithéliales pulmonaires. En présence de mucines, le SLPI perd de l'affinité vis-à-vis de l'HNE (Nadziejko et Finkelstein, 1994). Il est à noter que l'HNE induit la production de mucines, en particulier des mucines 1, 2 et 5AC via la libération du TGF- α de sa pro-forme (pro-TGF- α) et la fixation de ce dernier sur son récepteur, l'EGFR. Cette surproduction peut être inhibée par le SLPI (Griffin *et al.*, 2007).

Chapitre V : Utilisation thérapeutique des inhibiteurs

Une déficience génétique en $\alpha 1$ -PI, inhibiteur préférentiel de l'HNE *in vivo*, est souvent associée à l'apparition d'un emphysème pulmonaire. L'HNE est capable de dégrader les protéines de matrice extracellulaire et en particulier l'élastine du parenchyme pulmonaire. La déficience en $\alpha 1$ -PI augmente le risque de développement de BPCO. Une étude récente a montré que les patients déficients en $\alpha 1$ -PI atteints de BPCO présentent la même concentration plasmatique en ACT et en SLPI que les patients non déficients atteints de BPCO (Hollander *et al.*, 2007). Dans cette pathologie, il n'y a donc pas de compensation par une surproduction d'autres anti-élastase comme l'ACT et le SLPI, même si cette étude serait à compléter avec des mesures de concentration en élafine.

Il est clair aujourd'hui que les deux autres NSPs, la Pr3 et la CatG, sont également impliquées dans le remaniement de la matrice extracellulaire. Les NSPs sont impliquées dans les différentes pathologies inflammatoires pulmonaires comme les BPCO, le SDRA, la fibrose pulmonaire et l'asthme (Abboud et Vimalanathan, 2008 ; Barnes, 2008a). En plus de leurs activités protéolytiques vis-à-vis du tissu pulmonaire, elles vont réguler l'activité des MMPs en activant leurs pro-formes (Shamamian *et al.*, 2001) et en inactivant leurs inhibiteurs (Okada *et al.*, 1988). Elles vont également participer à l'obstruction progressive des bronches en induisant la production et la libération de mucines par les cellules épithéliales et peuvent libérer des fragments d'élastine possédant des activités chimioattractantes pour les macrophages (Hunninghake *et al.*, 1981). Bien qu'il y ait de nombreux autres facteurs impliqués dans ce type de pathologies comme le stress oxydatif et les médiateurs de l'inflammation (comme les cytokines ou les dérivés lipidiques par exemple), les thérapies anti-inflammatoires basées sur l'administration d'inhibiteurs des NSPs et principalement de l'HNE, ont émergé depuis une vingtaine d'années. L'étude du mode d'administration a également évolué. L'administration en intra-veineuse (IV) des inhibiteurs s'est avérée être moins efficace que l'administration par aérosol pour cibler les poumons.

A. L' $\alpha 1$ -PI

Les premières études ont été réalisées avec l' $\alpha 1$ -PI humain recombinant, produit dans la levure *S. cerevisiae*. Ces études ont montré que l' $\alpha 1$ -PI pouvait être aérosolisé et que son activité inhibitrice de protéases reste intacte après aérosolisation. De même, après

l'administration par aérosol chez le mouton et chez des patients déficients en α 1-PI, l'activité élastase est fortement diminuée dans les poumons suggérant que la barrière anti-élastase peut être restaurée (Hubbard *et al.*, 1989a, b, c). L'aérosolisation d' α 1-PI recombinant chez des patients atteints de mucoviscidose diminue l'activité enzymatique de l'HNE dans les LLBA et améliore l'élimination de *P. aeruginosa* (McElvaney *et al.*, 1991). Le temps de demi-vie de l' α 1-PI dans les poumons, après une administration par aérosol de 200 mg, est de 69,2 heures pour une activité anti-HNE de 53,2 heures chez des patients sains (Vogelmeier *et al.*, 1997). L' α 1-PI humain inhibe aussi bien l'élastase de neutrophile de rat que l'HNE et ne possède pas d'activité anti-microbienne. L'administration par aérosol de Prolastin (α 1-PI purifié à partir de plasma sanguin) améliore l'élimination de *P. aeruginosa* dans un modèle d'infection pulmonaire chez le rat et diminue l'inflammation due aux neutrophiles (Cantin et Woods, 1999). Des résultats similaires ont été observés dans le même modèle d'étude, après aérosolisation de MNEI, une autre serpine ciblant les trois NSPs et ne possédant pas d'activité antibactérienne (Woods *et al.*, 2005). L'aérosolisation d' α 1-PI diminue les effets destructeurs de l'élastase sur les poumons de souris exposées à la fumée de cigarettes. Dans ce modèle d'étude, l'aérosolisation de l' α 1-PI est plus efficace que l'administration en IV (Pemberton *et al.*, 2006). Geraghty *et al.* ont montré que l'aérosolisation de cet inhibiteur chez des patients déficients permet de diminuer l'activité protéolytique de l'HNE, de diminuer l'expression de la cathepsine B et de la MMP-2 induite par l'HNE et d'augmenter la concentration en SLPI et lactoferrine dans les LLBA de ces patients (Geraghty *et al.*, 2008). Chez l'homme, cet inhibiteur est administré par voie intraveineuse. Les bénéfices réels de l'utilisation de cet inhibiteur sont en cours d'analyse, en particulier les bénéfices sur la fonction pulmonaire, la progression de l'emphysème, la morbidité et la survie des patients (Russi, 2008).

B. Le SLPI

Des études ont également été réalisées avec le SLPI. Le SLPI est très rapidement éliminé lorsqu'il est administré en IV chez le mouton et chez l'homme (Bergenfildt *et al.*, 1990 ; Birrer *et al.*, 1992). Comme pour l' α 1-PI, le SLPI recombinant, produit en bactérie *E. coli*, reste actif après passage sous forme d'aérosol et augmente l'activité basale d'anti-élastase de 4 fois dans les LLBA de moutons, 3 heures après l'administration, avec un temps de demie-vie de 12 heures (Vogelmeier *et al.*, 1990). En 1992, McElvaney *et al.* ont étudié l'administration par aérosol de SLPI chez des patients atteints de mucoviscidose. Ils ont observé une réduction de l'activité protéolytique de l'HNE ainsi qu'une diminution de la

production d'IL-8 par les cellules épithéliales bronchiques et une diminution du nombre de neutrophiles dans les LLBA de ces patients (McElvaney *et al.*, 1992). De plus, le SLPI aérosolisé augmente la libération de glutathion, un puissant anti-oxydant, au niveau des voies aériennes supérieures chez le mouton (Gillissen *et al.*, 1993). En 1995, Stolk *et al.* ont montré que le SLPI aérosolisé ne se dépose pas très bien dans les parties pulmonaires mal ventilées ou au niveau des zones inflammatoires sévères, comme chez les patients atteints de mucoviscidose (Stolk *et al.*, 1995). Ces résultats, en plus du coût excessif de la molécule, expliquent pourquoi les essais cliniques d'une thérapie anti-inflammatoire avec le SLPI se sont arrêtés il y a une quinzaine d'années.

C. La trappine-2

En ce qui concerne l'élafine et la T2, aucune expérience n'a encore été décrite sur une administration par aérosol chez l'homme. En revanche, les propriétés anti-inflammatoires de la T2 ont été mises en évidence dans différents modèles de pathologies pulmonaires comme l'emphysème (Janelle *et al.*, 2006) et l'inflammation au LPS (Vachon *et al.*, 2002) chez la souris, un modèle d'ALI chez le hamster (Tremblay *et al.*, 2002) et chez la souris (Simpson *et al.*, 2001). La T2 diminue l'inflammation, réduit le nombre de neutrophiles dans les LLBA et diminue les lésions causées par l'activité protéolytique de l'élastase.

Dans leur modèle d'ALI, Tremblay *et al.* ont montré que l'élafine semble être moins efficace que la T2 (Tremblay *et al.*, 2002). Cette différence d'efficacité pourrait s'expliquer par le rôle du domaine cémentoïne dans la fixation de la T2 instillée au niveau des protéines de la matrice extracellulaire sous l'action de TGases. L'ancrage de la T2 limiterait ainsi son élimination et augmenterait son temps d'action, ce qui permettrait d'avoir un effet anti-inflammatoire plus efficace. Cette propriété de pouvoir constituer un réservoir d'inhibiteur au niveau de la matrice extracellulaire, que n'ont pas le SLPI et l' α 1-PI, confère à la T2 un potentiel thérapeutique très intéressant (Moreau *et al.*, 2008 ; Roghanian et Sallenave, 2008).

OBJECTIFS DE LA THESE

OBJECTIFS DE LA THESE

L'objectif général de la thèse est de produire un ou plusieurs inhibiteurs recombinants ciblant les trois NSPs à la fois en vue d'une utilisation en thérapie anti-inflammatoire basée sur l'administration par aérosol dans le cadre de pathologies pulmonaires inflammatoires comme les BPCO ou la mucoviscidose. Le choix de l'inhibiteur est important car il doit répondre à plusieurs critères :

- La taille de l'inhibiteur et la résistance à l'aérosolisation. En effet, plus l'inhibiteur sera petit, plus il lui sera facile de cibler les protéases liées aux membranes des neutrophiles après activation. Il semblerait que ces protéases actives soient résistantes aux inhibiteurs de taille plus importante comme les serpins bien que ces résultats soient controversés (Owen et Campbell, 1999 ; Korkmaz *et al.*, 2005). La structure de l'inhibiteur est un critère important pour la résistance à l'aérosolisation. Il faudrait que l'inhibiteur possède une structure compacte et globulaire, comme les inhibiteurs de la famille des chélonianines, qui possèdent 4 ponts disulfure.
- La polyvalence de l'inhibiteur. Il apparaît essentiel de cibler les trois NSPs et pas seulement l'HNE, car les trois protéases participent au processus inflammatoire. Les activités anti-inflammatoires de l' α 1-PI, du SLPI et plus récemment, du MNEI, administrés par aérosol dans différents modèles animaux d'inflammation ainsi que chez des patients sains et atteints de mucoviscidose, ont été décrits. Pour l'analyse de l'efficacité du traitement, seules l'activité de l'HNE et les concentrations en IL-8 ont été caractérisées. Aucune de ces études ne s'est intéressée à la mesure des activités enzymatiques des deux autres NSPs, la Pr3 et CatG lors de l'administration d'inhibiteurs. (Hubbard *et al.*, 1989 ; McElvaney *et al.*, 1992 ; Woods *et al.*, 2005).

Un inhibiteur qui posséderait ces différentes caractéristiques constituerait un candidat potentiel intéressant en vue d'une administration par aérosol. Parmi les différents inhibiteurs endogènes des NSPs, répertoriés dans le tableau X, les chélonianines (SLPI et élafine) semblent constituer le meilleur modèle d'étude. On a choisi la trappine-2 (T2) qui possède d'autres propriétés intéressantes pour l'application envisagée comme des propriétés anti-inflammatoires, anti-microbiennes ainsi que la capacité à se fixer sur les protéines de la

matrice extracellulaire par transglutamination. La T2 semble être un inhibiteur de choix pour le développement de molécules thérapeutiques.

Dans ce contexte, mes travaux se sont organisés autour de trois axes principaux de recherche. 1) L'étude des propriétés anti-bactériennes et anti-fongiques de la T2 vis-à-vis de pathogènes à tropisme pulmonaire, la caractérisation du mécanisme d'action de cet inhibiteur sur les différents pathogènes et enfin son rôle potentiel dans le contrôle de l'activité protéolytique des différents pathogènes (**Publication n°1**). 2) Le développement et la caractérisation de nouveaux inhibiteurs des NSPs, dérivés de la T2. Nous avons évalué les capacités inhibitrices de ces inhibiteurs vis-à-vis des protéases solubles, des protéases liées aux membranes des neutrophiles et après transglutamination sur différentes protéines de la matrice extracellulaire (**Publication n°2**). 3) La caractérisation *in vitro* des propriétés de transglutamination de la T2 et du SLPI par différentes transglutaminases et l'identification des acides aminés impliqués dans ces réactions (**Résultats non publiés**).

Inhibiteurs	$\alpha 2\text{M}$	$\alpha 1\text{-PI}$	ACT	MNEI	PI6	PI9	SCCA2	SLPI	Elaïne et trappine-2
Poids moléculaires	720 kDa	53 kDa	68 kDa	42 kDa	42 kDa	42 kDa	45 kDa	11,7 kDa	6 kDa (Ela) 10 kDa (T2)
Spectre d'inhibition	HNE, Pr3, CatG, PPE, Trypsine, Chymase, Plasmine, Thrombine	HNE, Pr3, CatG, PPE, Trypsine, Plasmine, Thrombine	CatG, Chymotrypsine, Chymase	HNE, Pr3, CatG, PPE, Chymotrypsine, hK3	HNE, CatG, Trypsine, Chymotrypsine, Thrombine, Facteur Xa, hK2	HNE, Granzyme B, Caspase-1	CatG, Pr3, Chymase	HNE, CatG, Trypsine, Chymotrypsine, Chymase, SOCE	HNE, Pr3, PPE, SOCE
Aérosolisation		+++		+++				+++	
Substrats de transglutaminase	+								+++
Activités anti-microbiennes								+++	+++
Activités anti-		+++		+++				+++	+++

Tableau XI : Comparaison des propriétés biologiques des différents inhibiteurs endogènes de l'HNE, de la Pr3 et de la CatG.

TRAVAUX PERSONNELS

Etude des propriétés anti-bactériennes et anti-fongiques de la trappine-2 (Publication n°1).

I. Contexte de l'étude

Les propriétés anti-microbiennes et anti-fongiques du SLPI ont été démontrées à la fin des années 90. Hiemstra *et al.* ont montré que le SLPI possède des activités anti-bactériennes contre les bactéries à Gram négatif et positif (Hiemstra *et al.*, 1996). En effet, le SLPI est actif contre *E. coli* et *S. aureus* avec des IC50 de 4,7 μ M et 7,6 μ M, respectivement. Ils ont également testé les deux domaines du SLPI (SLPI₁ et SLPI₂) séparément. Le SLPI₁ semble être plus actif que le second domaine. Mais lorsque les deux domaines sont incubés simultanément, l'effet anti-bactérien n'est pas aussi efficace que celui observé avec le SLPI natif vis-à-vis de *E. coli* et *S. aureus* (Hiemstra *et al.*, 1996). Le mécanisme d'action du SLPI n'a pas été clairement déterminé mais il semblerait que les charges de la molécule soient impliquées dans cette activité. Les tests de cette étude ont été réalisés en tampon phosphate de sodium 10 mM. Lorsque la concentration en NaCl est augmentée à 150 mM, les effets du SLPI sont inhibés (Hiemstra *et al.*, 1996). Il est à noter que le SLPI est moins actif vis-à-vis de *E. coli* que le lysozyme et que les défensines avec des IC50 de 4,7 μ M, 1,8 μ M et 1,4 μ M respectivement.

Le SLPI possède également des propriétés anti-fongiques vis-à-vis de *A. fumigatus* et *C. albicans* (Tomee *et al.*, 1998). Dans les mêmes conditions que dans l'étude précédente, Tomee *et al.* ont montré que le SLPI est plus actif que les défensines mais moins que le lysozyme avec des IC50 de 5,8 μ M, 6 μ M et 4,9 μ M, respectivement. Comme vis-à-vis des bactéries, le SLPI₁ est plus efficace que le domaine 2 contre *A. fumigatus*. Le SLPI est moins actif vis-à-vis de *C. albicans* avec une IC50 d'environ 10 μ M. Cette activité anti-*C. albicans* est dépendante de la concentration en SLPI et du temps d'incubation entre les inhibiteurs et les pathogènes. Comme l'effet anti-bactérien, l'activité fongicide du SLPI est sensible à la concentration en NaCl. Ces expériences suggèrent que les activités anti-bactériennes et anti-fongiques du SLPI sont dépendantes du caractère cationique de l'inhibiteur. En plus de son activité fongicide, le SLPI présente également une activité fongistatique vis-à-vis de *C. albicans* (Tomee *et al.*, 1998). Ces différentes propriétés anti-microbiennes confèrent au SLPI un rôle important dans l'immunité des muqueuses.

En ce qui concerne l'élaïne et la T2, seules les propriétés anti-microbiennes ont été étudiées. En effet, Simpson *et al.* ont montré que la T2 et l'élaïne possèdent des activités

anti-bactériennes vis-à-vis de *P. aeruginosa* (PAO1) et *S. aureus* (C1705) (Simpson *et al.*, 1999). La T2 semble très active à faibles concentrations ($<5 \mu\text{M}$) vis-à-vis de *P. aeruginosa*. A des concentrations supérieures à $5 \mu\text{M}$, la croissance de ce pathogène semble être activée. Le même effet est observé avec l'élafine mais pas avec le domaine cémentoïne isolé. En ce qui concerne *S. aureus*, la T2 semble être moins efficace que vis-à-vis de *P. aeruginosa* mais son activité anti-*S. aureus* augmente avec des concentrations en T2 croissantes. Dans ces conditions, l'élafine est moins efficace que la T2 mais elle est plus efficace que le domaine cémentoïne (Simpson *et al.*, 1999).

En 2003, Meyer-Hoffert *et al.* ont étudié les propriétés anti-bactériennes de l'élafine vis-à-vis de trois souches différentes de *P. aeruginosa* (ATCC 27853, ATCC 33348 et ATCC 15442) et d'une seule souche de *E. coli* (ATCC 35218) (Meyer-Hoffert *et al.*, 2003). Dans ces expériences, réalisées en tampon phosphate de sodium 10 mM, il semblerait que cette souche d'*E. coli* ne soit pas sensible à la T2 et que les différentes souches de *P. aeruginosa* ne réagissent pas de la même façon aux différentes concentrations d'élafine. Le mode d'action de la T2 n'a pas été étudié.

Le but de notre étude est de caractériser les propriétés anti-bactériennes de la T2 vis-à-vis de bactéries à Gram négatif comme *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *E. coli* (ATCC 25922) et à Gram positif comme *S. aureus* (ATCC 25923) mais également vis-à-vis d'un panel de souches à tropisme pulmonaire comme *Klebsiella pneumoniae*, *Branahmella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* et *Streptococcus pneumoniae*. Nous nous sommes également intéressés à l'action de la T2 vis-à-vis de pathogènes eucaryotes comme *C. albicans* et *A. fumigatus*.

II. Méthodologie

Afin de caractériser les propriétés anti-bactériennes et anti-fongiques de l'élafine et de la T2, nous avons utilisé trois approches différentes :

- Pour savoir si l'activité anti-microbienne de la T2 est dépendante de l'activité inhibitrice de protéase, nous avons utilisé un mutant atténué de la T2 sauvage, appelé T2 A62D/M63L. Ce mutant est un mauvais inhibiteur d'HNE et il n'inhibe plus la Pr3. Il possède une valeur de K_i 1000 fois supérieure à celle de la T2 sauvage vis-à-vis de l'HNE. En comparant l'activité anti-microbienne de la T2 et de la T2 A62D/M63L, nous avons pu étudier l'implication de la fonction inhibitrice de protéase dans cette activité.

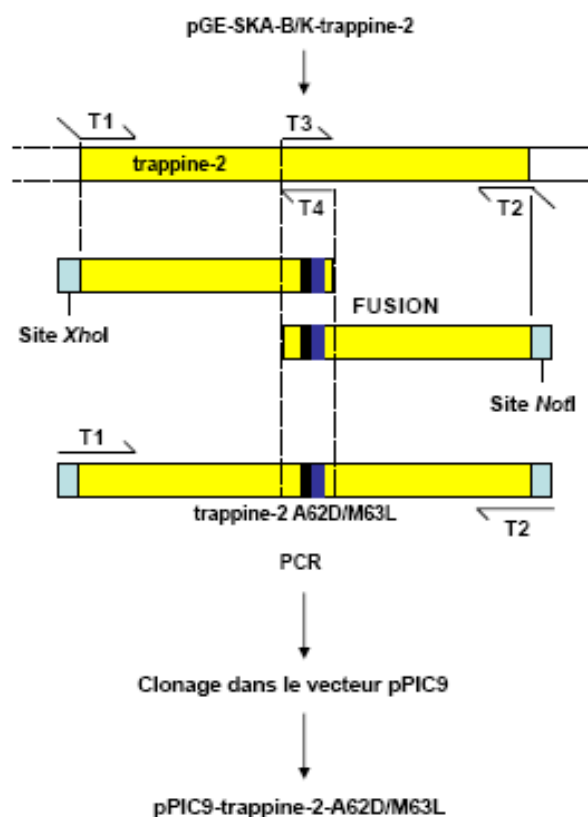
- Pour savoir si le caractère cationique de la T2 est impliqué dans l'activité anti-microbienne, nous avons étudié l'effet du NaCl et de l'héparine sur l'activité anti-microbienne de la T2.
- Pour savoir si la T2 agit au niveau des membranes des pathogènes, nous avons observé les pathogènes en présence de T2 en microscopie électronique à balayage.

Toutes les souches de bactéries non ATCC, *C. albicans* et *A. fumigatus* ont été isolées de patients au CHU de Tours.

A. Production du mutant atténué T2 A62D/M63L

Toutes les PCR et les fusions décrites ci-dessous, sont effectuées avec un mélange d'ADN polymérase haute fidélité (Taq/Pwo) (Roche). L'ADNc de la T2, cloné dans le vecteur pGE-SKA-B/K, est utilisé comme matrice de départ pour réaliser la mutagenèse dirigée (Figure 29). Cette matrice d'ADN (20 ng) est amplifiée par PCR avec les couples d'amorces T1/T4 (PCR n°1) et T2/T3 (PCR n°2). Les PCR sont réalisées sur 30 cycles (chaque cycle : 94°C pendant 10 s, 55°C pendant 30 s et 68°C pendant 30 s). Les produits de PCR n°1 et n°2 sont purifiés avec le kit « NucleoSpin Extract II » (Macherey-Nagel), selon les recommandations du fournisseur, puis fusionnés sur 20 cycles (chaque cycle : 94°C pendant 30 s, 55°C pendant 25 mn puis 68°C pendant 5 mn). Le produit de fusion dilué au 1/100^{ème} est amplifié par PCR avec les amorces T1 et T2 sur 30 cycles (chaque cycle : 94°C pendant 10 s, 55°C pendant 30 s et 68°C pendant 30 s). L'ADN trappine-2-A62D/M63L ainsi obtenu est digéré par les enzymes *XhoI* et *NotI* puis inséré dans le vecteur pPIC9 (Figure 29), préalablement digéré par ces mêmes enzymes. La réaction de ligature a lieu en présence d'ADN ligase du bactériophage T4 (1U) pour donner le vecteur pPIC9-trappine-2-A62D/M63L (Figure 30).

Les bactéries compétentes *E. coli* XL-1 Blue sont transformées avec le vecteur d'expression pPIC9-trappine-2-A62D/M63L par un choc thermique à 42°C pendant 45 s. Les bactéries transformées sont étalées sur un milieu LB agar ampicilline (100 µg/mL), tétracycline (10 µg/mL) et incubées 16 heures à 37°C. Quelques clones sont sélectionnés pour vérifier la présence du vecteur pPIC9-trappine-2-A62D/M63L. Chaque clone sélectionné est lysé à 100°C puis une PCR est effectuée sur le lysat en utilisant les amorces T1 et T2. L'amplification est réalisée sur 30 cycles (chaque cycle : 94°C pendant 10 s, 55°C pendant 30 s et 68°C pendant 30 s).



Amorces utilisées :

T1 : 5'-CGAC TCGAGAAAAGAGCTGTCACGGGAGTTCCT-3'

T2 : 5'-CGAGC GGCCGCCCCTCTCACTGGGGAAC-3'

T3 : 5'-CCGGTGCGACT**TT**GTTGAATCCC-3'

T4 : 5'-GGGATTCAACAAGTCGCACCGG-3'

Figure 29 : Méthodologie de construction du mutant T2 A62D/M63L et séquences des amorces utilisées. En noir, mutation de Ala62 en Asp et en bleu, mutation de Met63 en Leu. Les sites de restriction de *Xho*I : C TCGAG (inclus dans T1) et de *Not*I : GC GGCCGC (inclus dans T2) sont soulignés. En gras noir, codon Asp (GAC) et en gras bleu, codon Leu (TTG). Les amorces de mutagenèse T3 et T4 sont complémentaires.

Un clone positif est mis en culture dans 5 mL de milieu LB ampicilline (100 µg/mL) pendant 16 heures à 37°C sous agitation à 250 t/mn. La culture bactérienne est centrifugée à 5000 t/mn, 5 mn, 4°C. L'ADN plasmidique est préparé à partir du culot de bactéries, à l'aide du kit « QIAprep Spin Miniprep Kit » (QIAGEN) selon les recommandations du fournisseur. La présence de l'insert dans le vecteur est vérifiée par digestion de l'ADN plasmidique par les enzymes *Xho*I et *Not*I. L'insert est ensuite séquencé afin de valider la construction.

Les levures *Pichia pastoris* GS115 possèdent un gène histidinol déshydrogénase muté (*his4*) non fonctionnel. Ces levures ne peuvent pas synthétiser l'histidine, essentielle à leur survie. Le vecteur pPIC9 possède ce gène fonctionnel (*HIS4*). Ce vecteur possède également

une partie du gène de l'alcool oxydase 1 (*AOX1*). Le vecteur pPIC9 va pouvoir s'intégrer, par recombinaison homologue, dans le locus *his4* ou *AOX1* du génome de la levure. Dans notre étude, tous les vecteurs construits ont été intégrés dans le locus *his4* comme il a été fait précédemment pour la production de l'élafine et de la T2 dans ce même système d'expression (Zani *et al.*, 2004).

Le vecteur pPIC9-trappine-2-A62D/M63L est linéarisé au niveau du gène *HIS4* par l'enzyme *SalI*. L'ADN linéarisé (10 µg) est ensuite incubé avec les levures (80 µL) aptes à l'électroporation dans la glace pendant 5 mn. Ensuite, les levures sont électroporées à 1500 V pendant 5 ms (électroporateur de type ECM 399 (BTX)). Les levures sont supplémentées avec 1 mL de sorbitol 1 M glacé, homogénéisées puis incubées à 29°C pendant 2h. Après centrifugation à 7000 tours/mn pendant 5 mn à 29°C, les culots sont homogénéisés puis étalés sur une gélose sélective RD (Regeneration Dextrose Medium) sans histidine. Les levures sont incubées à 29°C jusqu'à l'apparition des clones (environ trois à quatre jours). Seules les levures ayant intégré le vecteur, de façon stable, dans leur génome, peuvent pousser.

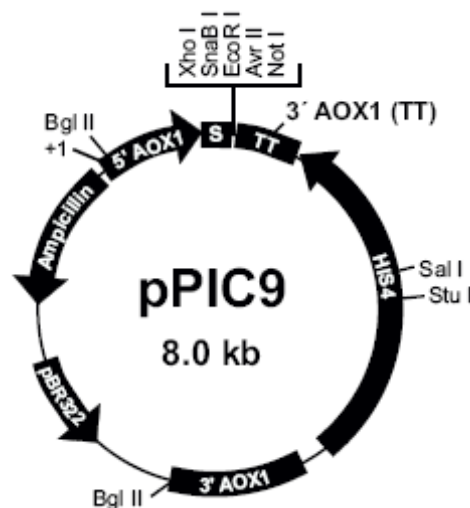


Figure 30 : Représentation schématique du vecteur pPIC9. *Ampicillin* : gène de résistance à l'ampicilline, *pBR322* : origine de réplication bactérienne de *E. coli*, *S* : peptide signal de sécrétion de *S. cerevisiae* (peptide α), 5' *AOX1* : promoteur de l'alcool oxydase 1 activable par le méthanol, 3' *AOX1*(TT) : site de terminaison de la transcription, *HIS4* : gène de l'histidinol déshydrogénase, *XhoI*, *NotI*, *SnaBI*, *EcoRI*, *AvrII* : sites de restriction permettant le clonage de l'ADNc à exprimer. Ce clonage doit s'effectuer en phase avec le peptide α . *BglII*, *SalI* : sites de restriction permettant l'intégration aux loci *his4* (*SalI*) et *AOX1* (*BglII*) de la levure à transformer.

B. Tests d'activité anti-microbienne

Nous avons réalisé nos tests d'activité anti-bactérienne et anti-fongique de la façon suivante. Les microorganismes (bactéries et *C. albicans*), en milieu de phase exponentielle de

croissance, sont centrifugés puis lavés deux fois avec du PBS (*Phosphate Buffer Saline*) qui est un tampon phosphate de sodium 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4. Les différents inhibiteurs ont été incubés à différentes concentrations (1 à 30 μ M) avec un nombre fixe de cellules ($5 \cdot 10^2$) pendant 3h à 37°C dans un volume de 100 μ L puis déposées sur boîtes de Pétri pour comptage. La survie des microorganismes a été calculée en pourcentage de bactéries survivantes de la façon suivante : $(N/N_{\text{contrôle}}) \cdot 100$ avec $N_{\text{contrôle}}$ et N représentant le nombre de cellules au départ et après 3 heures d'incubation.

Pour *A. fumigatus*, nous avons testé l'efficacité de nos inhibiteurs à la fois sur les spores métaboliquement inactifs (spores en dormance) et actifs (*swollen*). L'activation des spores s'effectue par choc thermique pendant 19h à 25°C puis 2h à 37°C sous agitation. Pour les tests, on active un nombre fixe de spores (500 spores) dans 100 μ L de PBS, puis on ajoute les inhibiteurs à différentes concentrations (1 à 30 μ M). Après 3h d'incubation à 37°C, on dépose les microorganismes sur boîte de Pétri. Leur survie est calculée de la même façon que pour les bactéries et *C. albicans*.

III. Résultats

A. Activité anti-microbienne de la T2

1. Activité anti-bactérienne de la T2 (**Publication n°1, figures 2 et 3**)

Nous avons montré que la T2 présente une activité bactéricide vis-à-vis de toutes les souches testées dans cette étude. Cette activité est dépendante des concentrations de T2 testées sauf pour *K. pneumoniae* et *H. influenzae* qui semblent être moins sensibles aux fortes doses de T2 ($>5 \mu$ M). La T2 n'est pas aussi efficace sur les différentes souches testées, c'est pourquoi nous avons calculé la dose minimale effectrice ou MED (*Minimum Effective Dose*), qui est la concentration minimale d'inhibiteur tuant les bactéries de façon significative dans nos expériences. Pour *K. pneumoniae* et *H. influenzae*, la MED est de 2 μ M, pour *E. coli* la MED est de 10 μ M et pour les autres souches, la MED est de 15 μ M. L'activité anti-microbienne maximale de la T2 a été observée à des concentrations de 5 μ M pour *K. pneumoniae* et *H. influenzae* et de 15 à 30 μ M pour les autres souches. L'activité anti-bactérienne de la T2 A62D/M63L a été testée sur *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922) et *K. pneumoniae*. La T2 A62D/M63L présente les mêmes activités anti-bactériennes que la T2 sauvage, ce qui suggère que la fonction

inhibitrice de protéase de la T2 n'est pas impliquée dans l'activité anti-bactérienne de l'inhibiteur, vis-à-vis des souches testées et dans ces conditions.

2. Activité anti-fongique de la T2 (**Publication n°1, figures 4 et 5**)

Nous avons montré que la T2 présente une activité fongicide vis-à-vis des souches de *C. albicans* et d'*A. fumigatus* testées dans cette étude. Cette activité est dépendante des concentrations de T2 testées. L'activité anti-fongique maximale de la T2 vis-à-vis d'*A. fumigatus* et de *C. albicans* a été observée à 15 μ M. Il semblerait que la T2 soit plus active vis-à-vis d'*A. fumigatus* que de *C. albicans*. Avec 15 μ M de T2, on observe 40% et 70% de survie des pathogènes respectivement. L'activité fongicide de l'élafine est moins importante que celle de la T2. A 15 μ M, on observe 90% et 80% de survie pour *A. fumigatus* et *C. albicans* respectivement. Ces résultats indiquent que le domaine cémentoïne de la T2 doit jouer un rôle important dans l'activité anti-fongique. La T2 A62D/M63L présente la même activité fongicide que la T2 sauvage, ce qui suggère que la fonction inhibitrice de protéase de la T2 n'est pas impliquée dans l'activité anti-fongique de l'inhibiteur vis-à-vis des souches testées. L'activité anti-*C. albicans* de la T2 est également dépendante du temps d'incubation de l'inhibiteur avec les pathogènes. Après 18 heures d'incubation, on observe 2% de survie du pathogène.

B. Implication du caractère cationique de l'inhibiteur dans l'activité anti-microbienne

1. Influence de l'héparine (**Publication n°1, figures 6 et 7**)

La fonction inhibitrice de protéase n'étant pas impliquée dans l'activité anti-microbienne, nous nous sommes intéressés au caractère cationique de l'inhibiteur. L'élafine possède une charge nette de +3 et la T2 de +7 à pH neutre. De nombreux peptides cationiques anti-bactériens comme la LL-37 et les défensines sont capables de lier l'héparine. Nous avons montré que l'élafine et la T2 peuvent se fixer sur une colonne d'héparine. L'affinité des inhibiteurs pour l'héparine peut être diminuée en présence des concentrations croissantes de NaCl. Nous avons montré que l'élafine peut être éluée avec des concentrations de 0,15 à 0,3M en NaCl alors que la T2 est éluée avec des concentrations plus élevées, de 0,3 à 1M en NaCl. Ces résultats signifient que l'élafine et la T2 peuvent lier l'héparine et que la T2 possède plus d'affinité pour l'héparine.

Nous avons testé l'effet de l'héparine sur l'activité anti-bactérienne et anti-fongique de la T2 vis-à-vis de *S. aureus* (ATCC 25923) et *C. albicans*. L'activité anti-microbienne de la

T2 est totalement inhibée en présence d'héparine (rapport héparine/inhibiteur : 10), ce qui signifie qu'il y a une compétition entre l'inhibiteur et l'héparine. Lorsque l'inhibiteur est complexé à l'héparine, il n'est plus actif vis-à-vis des pathogènes, ce qui suggère que le caractère cationique de la T2 est impliqué dans l'activité anti-microbienne.

2. Influence de la concentration en NaCl (**Publication n°1, figure 7**)

En plus de l'héparine, nous avons testé l'effet de la concentration du NaCl sur l'activité anti-bactérienne et anti-fongique de la T2 vis-à-vis de *S. aureus* (ATCC 25923) et *C. albicans*. L'activité anti-microbienne de la T2 est totalement inhibée en présence de 0,3M de NaCl. Cette compétition en présence de NaCl confirme le rôle du caractère cationique de la T2 dans l'activité anti-microbienne.

C. Etude en microscopie électronique à balayage (SEM) (**Publication n°1, figure 10**)

Nous avons étudié en microscopie électronique à balayage (SEM) le mode d'action de la T2 vis-à-vis de *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *S. aureus* (ATCC 25923) et *C. albicans*. La T2 semble agir sur l'intégrité des membranes des différents pathogènes testés. Nous avons observé la formation de plis et de pores au niveau des membranes qui conduisent à la destruction cellulaire. Ce mode d'action semble être commun aux différents peptides cationiques anti-microbiens impliqués dans la défense immunitaire innée comme les défensines (Morgera *et al.*, 2008) et la LL-37 (Oren *et al.*, 1999).

D. Rôle de la T2 dans la relation hôte/pathogène

1. Inhibition de protéases microbiennes (**Publication n°1, figure 8**)

Lors d'une infection, les pathogènes sécrètent des protéases, de façon à envahir rapidement les tissus environnants. Parmi ces protéases, on retrouve des protéases à sérine susceptibles d'être inhibées par la T2. Nous nous sommes intéressés au rôle de la T2 dans le contrôle éventuel de l'activité protéolytique d'origine microbienne. Les surnageants de nos cultures bactériennes et fongiques ont été testés sur une protéine de la matrice extracellulaire, la fibronectine. Nous avons observé que seul le surnageant d'*A. fumigatus* est capable de dégrader la fibronectine, dans nos conditions expérimentales. De plus, cette activité enzymatique est inhibée par la T2 mais pas par le mutant atténué, ce qui implique que la

fonction inhibitrice de la T2 (et/ou de l'élafine) peut jouer un rôle dans la protection de l'intégrité des protéines de la matrice extracellulaire lors d'infections par *A. fumigatus*.

2. Dégradation de la T2 par les protéases microbiennes (**Publication n°1, figure 9**)

Dans ces expériences, nous avons testé l'intégrité de la T2 dans les surnageants de nos cultures bactériennes et fongiques. Seul le surnageant de culture de *C. albicans* est capable de dégrader la T2. La T2 est clivée dans le domaine cémentoïne et ce clivage dépend du temps d'incubation. La forme dégradée de la T2 a une masse proche de celle de l'élafine. Elle correspond à l'élafine avec quelques acides aminés du domaine cémentoïne. La protéase responsable de ce clivage est une protéase acide car seule la pepstatine inhibe la dégradation de l'inhibiteur.

IV. Conclusions et perspectives

Dans notre étude, nous avons montré que la T2 possède des activités anti-bactériennes vis-à-vis d'un panel plus large de bactéries. En effet, nous avons testé des bactéries à Gram négatif et positif comme *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *S. aureus* (ATCC 25923) et des souches à tropisme pulmonaire isolées de patients comme *K. pneumoniae*, *H. influenzae*, *B. catarrhalis* et *S. pneumoniae*. Nous avons également montré, pour la première fois, que la T2 possède une activité anti-fongique vis-à-vis de *C. albicans* et d'*A. fumigatus*. Cette activité anti-microbienne est, comme pour celle du SLPI, indépendante de la fonction inhibitrice de protéase mais dépend du caractère cationique de l'inhibiteur. Les activités anti-microbiennes ont été observées dans du PBS contenant 150 mM de NaCl. Les études précédentes ont été réalisées en tampon phosphate sans NaCl. C'est pourquoi nos résultats ne peuvent être comparés directement avec ceux obtenus par Meyer-Hoffert *et al.* qui ont également travaillé avec la souche de *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Meyer-Hoffert *et al.*, 2003).

Nous avons mis en évidence ce mécanisme d'action en comparant l'activité anti-microbienne de l'inhibiteur sauvage à celle d'un mutant atténué. Ces résultats ont été confirmés avec des tests en présence d'héparine et de NaCl, qui inhibent totalement l'activité anti-microbienne de la T2. Nous avons également montré que la T2 interagit avec les membranes des pathogènes. En effet, nous avons montré que l'incubation des pathogènes *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *S. aureus* (ATCC 25922) et *C. albicans* avec 5 μ M de T2 entraîne une modification de la structure membranaire avec la formation de plissements et de pores

conduisant à la mort des microorganismes. Une étude récente a montré que la T2 peut inhiber une protéase de *P. aeruginosa* (ATCC 33348), l'arginyl peptidase ou protéase IV (AP⁺), protéase que ne possède pas la souche de *P. aeruginosa* (ATCC 27853) testée dans notre étude (Bellemare *et al.*, 2008). L'activité inhibitrice de protéase de la T2 serait impliquée dans l'inhibition de la croissance de *P. aeruginosa* AP⁺, à des concentrations inférieures à 8 µM. De plus, ils ont montré que la T2 se fixe de la même façon au niveau des membranes des deux souches de *P. aeruginosa* (ATCC 33348 AP⁺ et ATCC 27853). En revanche, le domaine cémentoïne et le domaine élafine ne semblent pas interagir de la même façon avec les membranes. Pour le domaine cémentoïne, les interactions sont dépendantes du caractère cationique de ce domaine mais pour le domaine élafine, les interactions semblent être principalement hydrophobes (Bellemare *et al.*, 2008).

En plus de ses propriétés bactéricides et fongicides, la T2 peut inhiber une (des) protéase(s) d'origine microbienne. En effet, nous avons montré que la T2 inhibe la dégradation de la fibronectine par un surnageant de culture d'*A. fumigatus*. La T2 A62D/M63L n'inhibe pas cette activité protéolytique. Nous avons observé des résultats similaires avec une autre souche d' *A. fumigatus*, souche isolée d'un patient atteint de mucoviscidose. Le rôle d'inhibiteur de protéase d'*A. fumigatus* confère à la T2 un rôle important dans l'organisation de la défense immunitaire contre ces pathogènes.

Dans cette étude, nous avons montré que l'activité anti-*Candida* est dépendante du temps d'incubation et de la concentration en T2 testée. Le surnageant de culture de *C. albicans* est le seul surnageant de culture capable de dégrader la T2 dans le domaine cémentoïne. De plus, nous avons montré que l'élafine est moins active que la T2 contre *C. albicans*. La dégradation du domaine cémentoïne pourrait donc être un moyen de défense du pathogène contre notre défense immunitaire innée. Des études récentes ont montré que certaines souches d'*Aspergillus fumigatus* et d'*Aspergillus flavus* sont capables de sécréter des inhibiteurs d'HNE (Okumura *et al.*, 2004 ; Okumura *et al.*, 2006). Ces inhibiteurs permettraient à ces souches de se protéger contre l'activité fongicide des protéases également impliquées dans notre défense immunitaire comme l'HNE.

Cette étude confirme le rôle important de la T2 dans la réponse immunitaire innée. Elle possède à la fois des propriétés anti-inflammatoires dépendantes et indépendantes de son activité anti-protéase et des activités anti-microbiennes vis-à-vis d'un large spectre de bactéries à Gram positif et négatif ainsi que des pathogènes eucaryotes comme *C. albicans* et *A. fumigatus*. De plus, la T2 inhibe spécifiquement une(des) protéase(s) d'*A. fumigatus*, ce qui

lui confère un rôle éventuel dans la protection des tissus lors d'une infection par ce pathogène. Nous avons montré que cette activité protéolytique se retrouve également dans une autre souche d'*A. fumigatus*, isolée d'un patient atteint de mucoviscidose. Une étude récente a montré qu'une activité « élastase-like » se retrouvait dans 95,6% des souches d'*A. fumigatus* isolées de patients atteints d'aspergillose pulmonaire invasive (Alp et Arikan, 2008). Une seconde étude a montré qu'une co-administration d'un inhibiteur d'élastase d'*A. flavus* (AFLEI) et d'amphotéricine B, traitement utilisé en clinique contre les infections fongiques, dans un modèle murin d'aspergillose pulmonaire induite par *A. flavus*, est plus efficace que le traitement à l'amphotéricine B seul (Okumura *et al.*, 2008). Chez les patients immunodéprimés, en chimiothérapie, une co-administration de T2 et d'amphotéricine B pourrait être envisagée en vue de diminuer les infections par les pathogènes opportunistes comme *A. fumigatus*.

PUBLICATION N°1

**Baranger Kévin, Zani Marie-Louise, Chandenier Jacques,
Dallet-Choisy Sandrine et Moreau Thierry.**

The antibacterial and antifungal properties of trappin-2 (pre-elafin) do not depend on its protease inhibitory function

FEBS Journal 386 (2008), 2008-2020.

Research paper

Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family

Thierry Moreau*, Kévin Baranger, Sébastien Dadé, Sandrine Dallet-Choisy,
Nicolas Guyot¹, Marie-Louise Zani

INSERM U618 “Protéases et Vectorisation Pulmonaires”, IFR 135 “Imagerie fonctionnelle”, Université François Rabelais, Tours, France

Received 21 June 2007; accepted 7 September 2007

Available online 22 September 2007

Abstract

Elafin and SLPI are low-molecular weight proteins that were first identified as protease inhibitors in mucous fluids including lung secretions, where they help control excessive proteolysis due to neutrophil serine proteases (elastase, proteinase 3 and cathepsin G). Elafin and SLPI are structurally related in that both have a fold with a four-disulfide core or whey acidic protein (WAP) domain responsible for inhibiting proteases. Elafin is derived from a precursor, trappin-2 or pre-elafin, by proteolysis. Trappin-2, which is itself a protease inhibitor, has a unique N-terminal domain that enables it to become cross-linked to extracellular matrix proteins by transglutaminase(s). SLPI and elafin/trappin-2 are attractive candidates as therapeutic molecules for inhibiting neutrophil serine proteases in inflammatory lung diseases. Hence, they have become the WAP proteins most studied over the last decade. This review focuses on recent findings revealing that SLPI and elafin/trappin-2 have many biological functions as diverse as anti-bacterial, anti-fungal, anti-viral, anti-inflammatory and immuno-modulatory functions, in addition to their well-recognized role as protease inhibitors.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Serine protease; Protease inhibitors; Inflammation; SLPI; Elafin; Trappin-2

1. Introduction

Serine proteases and their natural protein inhibitors have been extensively studied. About 20 structurally different families of protease inhibitors have been identified, including α -helical, β -sheet and α/β proteins, as well as small disulfide-rich proteins. Based on their mechanisms of action, three types of serine protease inhibitors are now recognized: canonical inhibitors, non-canonical inhibitors and serpins. The canonical inhibitors bind to the enzyme through an exposed convex binding loop, the conformation of which is complementary to the

active site of the enzyme. The conformations of the main chain of the binding loops of these inhibitors are all remarkably similar (hence the term ‘canonical’), although their overall structures are very different. These inhibitors act like an ideal substrate, forming an enzyme–inhibitor complex that prevents the protease acting on substrates. This is also known as the standard mechanism [1]. The non-canonical inhibitors form tight complexes with their target enzymes as a result of numerous interactions involving both the N-terminal part of the inhibitor and secondary interactions outside the active site. Serpins, like the canonical inhibitors, interact with their cognate enzymes in a substrate-like manner via an exposed loop which is cleaved as soon as the serpin interacts with the protease active site [2]. This cleavage leads to the formation of a covalent ester between the active serine (Ser195) of the proteinase and the backbone carbonyl of the cleaved loop. The loop region then becomes inserted into a β -sheet of the serpin molecule. This insertion of the loop causes the covalently

Abbreviations: α 1-PI, alpha1-proteinase inhibitor; ECM, extracellular matrix proteins; LPS, lipopolysaccharide; SNP, single nucleotide polymorphism.

* Corresponding author. Tel.: +33 2 47 36 61 77; fax: +33 2 47 36 60 46.

E-mail address: thierry.moreau@univ-tours.fr (T. Moreau).

¹ Present address: Respiratory Research Division, Royal College of Surgeons in Ireland, Dublin, Ireland.

attached protease to be translocated by over 70 Å from its initial position. The distortion of the protease active site resulting from this dramatic conformational change inactivates the protease.

The first classification of canonical inhibitors, by Laskowski and Kato [1], distinguished 8 families, based on sequence similarities and disulfide bond topology. A total of 18 families of canonical inhibitors are presently recognized [3], but this classification is evolving into a hierarchical, structure-based scheme, as proposed by the MEROPS database (<http://merops.sanger.ac.uk>) [4]. The chelonianin family, Family I17 Clan IP in the MEROPS database, includes two well-characterized homologous inhibitors of human origin: the secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elafin, together with its precursor pre-elafin (also known as trappin-2). The family name originates from the early observation that the sequence of SLPI is similar to that of the second domain of the chelonian red sea turtle (*Caretta caretta*) inhibitor [5], also known as chelonianin [6].

2. History

Human SLPI was originally isolated from bronchial secretions [7,8] and further characterized by two independent groups in 1986 who purified it from urine [5] or from parotid gland secretions [9]. SLPI is a non-glycosylated, basic ($pI \approx 9.5$), 11.7 kDa single-chain protein of 107 amino acids, with a high affinity for the neutrophil serine proteinases, elastase and cathepsin G. It is composed of two domains, each containing eight cysteine residues that form four disulfide bonds and stabilize the domain structure (Fig. 1). This cysteine-rich domain is also called the WAP domain because the motif signature describing the position of the conserved cysteines and the location of the disulfide bonds was first found in the whey acidic protein (WAP), which is abundant in rodent milk [10]. The human SLPI gene is on chromosome 20q12-13.2 and consists of four exons and three introns spanning approximately 2.6 kb [11,12]. There is a good correlation between the domain structure and the gene organization because exon II encodes the first WAP-type domain and exon III encodes the second. This suggests that these two domains were generated by gene duplication, but the event probably took place a long time ago because of the relatively low similarity of their sequences (30% identity). SLPI is constitutively produced at many mucosal surfaces and is also produced by neutrophils, macrophages and lung epithelial cells [13]. Expression of SLPI gene is significantly increased by progesterone [14] and by the pro-inflammatory cytokines TNF- α and IL-1 β [15].

SLPI has been given many different names, depending on the tissue of origin. These include: human seminal plasma inhibitor I (HUSI-I), cervix uterine secretion inhibitor (CUSH), bronchial inhibitor (BI), antileukoprotease (ALP) and mucous proteinase inhibitor (MPI), which reflects its presence in almost all mucous fluids. However, SLPI is now the most commonly used name for this ubiquitous molecule. Its physiological concentration in saliva is 0.35–2 μM [16,17] while in the lungs, its

concentration is higher in the upper airways compared to the alveolar compartment. SLPI concentration in normal, non-smoking individuals was found to be 8.7 μM in epithelial lining fluid obtained from upper airways and 0.6 μM in the lower respiratory tract [18]. Taggart et al. [19] found similar SLPI concentrations in normal patients but SLPI level was significantly lower in a group of patients with emphysema. In addition, it has been demonstrated that SLPI in bronchial secretions is only one-third functional, i.e. not fully active as a protease inhibitor, although it is intact and apparently not complexed to any protease(s) [18].

Elafin and its precursor protein trappin-2 (or pre-elafin) are the other well-characterized serine protease inhibitors of the chelonianin family. Elafin, also called skin-derived antileukoprotease (SKALP), was first purified by two groups in 1990, independently, as an elastase inhibitor from the skin of patients with psoriasis [20,21]. Elafin was subsequently isolated from human lung sputum by Sallenave et al. and called the elastase-specific inhibitor (ESI) [22]. Cloning the elafin cDNA revealed that the molecule was larger than expected, having an N-terminal non-inhibitory domain [23–25]. The whole molecule was then termed trappin-2, ‘trappin’ being an acronym for TRansglutaminase substrate and wAP domain containing ProteIN [26]. Trappin-2 is an unglycosylated 95-residue cationic protein ($pI \approx 9$) comprising (Fig. 1) an N-terminal domain (38 residues) or cementoin domain [27] containing several repeated motifs with the consensus sequence Gly-Gln-Asp-Pro-Val-Lys that can anchor the whole molecule to extracellular matrix proteins by transglutaminase-catalyzed cross-links. The C-terminal inhibitory WAP-type domain (57 residues) [28], corresponding to elafin, is structurally similar to the SLPI domains (about 40% sequence identity with each SLPI domain). Trappin-2 is encoded by the PI3 gene in the same chromosome region 20q12-13 as SLPI gene and is composed of three exons [23] spanning about 2 kb. The first exon codes for the 5'-untranslated region, the signal peptide and the first few amino acids of the mature protein, the second exon encodes most of the mature protein and the third exon encodes the 3'-untranslated region. This implies that the elafin found in lung secretions is released from its precursor by proteolysis. We found that mast cell tryptase could be a physiological elafin-releasing enzyme because, unlike many other proteases tested, it can specifically and rapidly generate elafin *in vitro* from its precursor trappin-2 [29]. The PI3 gene is constitutively expressed in several epithelia that are continuously subjected to inflammatory stimuli, such as the skin, lung, oral cavity and the vagina [30,31–33], and it is upregulated in inflammatory conditions such as psoriasis [20]. There is little trappin-2 in the normal skin, but its production is readily induced by trauma or irritation (for example, tape stripping) [34]. Transcriptional upregulation of PI3 gene is induced by pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β and TNF- α [15,35], heat-inactivated *Pseudomonas aeruginosa* [30] and elastase [36].

Like SLPI gene, the PI3 gene is also expressed in macrophages [37] and neutrophils [38]. While no polymorphism has been reported for the SLPI gene, the PI3 gene was recently

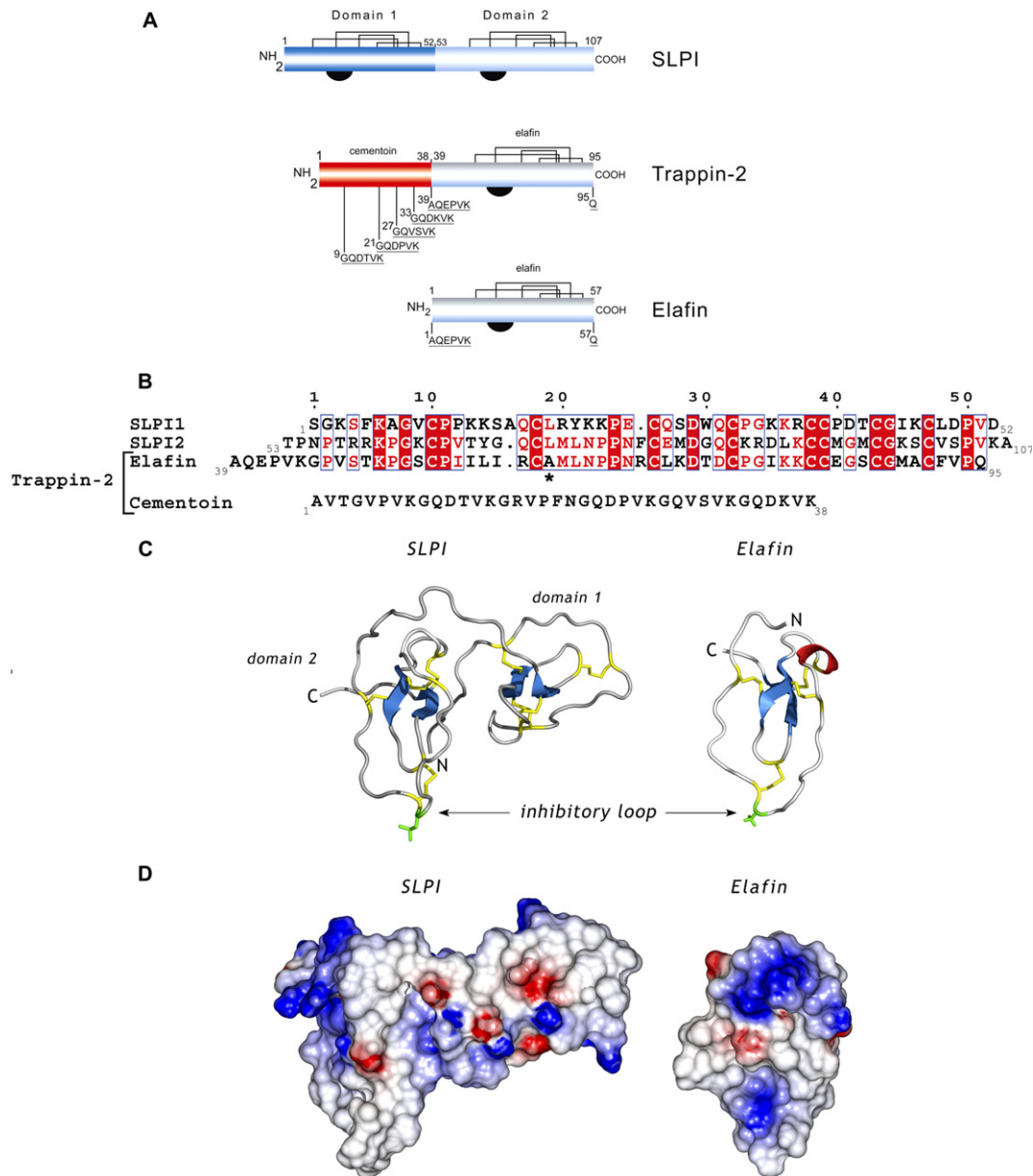


Fig. 1. (A) Diagram of the structure of SLPI, elafin and trappin-2, showing the domain organisation, disulfide bond topology (plain line), the inhibitory loop (half black disk) and the transglutaminase substrate motifs (underlined sequences) of trappin-2 and elafin. Four of these repeated motifs are located in the N-terminal cementoin domain and one is in the elafin inhibitory domain. The C-terminal glutamine of trappin-2 and elafin may also be engaged in the formation of a transglutaminase-catalyzed isopeptide bond [111]. (B) Sequence alignments of SLPI domain 1 (N-terminal), SLPI domain 2 (C-terminal) and elafin. The SwissProt accession numbers of SLPI and elafin sequences are P03973 and P19957, respectively. The sequence of the unrelated N-terminal cementoin domain of trappin-2 is also shown (P19957). * denotes the position of the P1 residue in each WAP domain. (C) Ribbon diagram of the 3D structures of SLPI, extracted from the SLPI-chymotrypsin complex (Wolfram Bode, personal communication), and of elafin, from the pancreatic elastase-elafin complex (PDB 1FLE). The P1 residue side-chain of each inhibitor (Leu72 in SLPI and Ala24 in elafin) is shown in stick representation and colored green. The disulfide bonds of each WAP domain are colored yellow. (D) Molecular surfaces of SLPI and elafin in the same orientation as in (C) colored according to the electrostatic surface potential (blue, positive regions; red, negative regions). Note the different distributions of charges despite the similar sequences and structures of the elafin and SLPI domains.

found to be highly polymorphic, with 23 SNPs, 11 of which are located in the promoter region [39]. This suggests that these SNPs could influence the expression of PI3 gene in various tissues. The concentration of elafin in the bronchial secretions of normal patients is in the range 1.5–4.5 μM [33,40], and it is believed to represent about 20% of the three elastase inhibitors of the lungs (elafin, SLPI, α_1 -PI) as measured in

broncho-alveolar fluids from normal patients [33]. Most studies in the literature have focussed on elafin, however published data are often unclear as to whether results concern elafin or its precursor trappin-2.

While SLPI and elafin are the best characterized molecules in this group, 14 genes encoding WAP-type proteins have been identified at the same locus on human chromosome

20q12-13.1 [41]. However, the sequences are not well conserved, except for the cysteine residues. In particular, the sequence that encompasses the putative inhibitory loop is very different, both in amino acid composition and in length, as compared to that of elafin and SLPI, indicating that these proteins may have no inhibitory activity. Surprisingly, while many WAP proteins related to SLPI and elafin have been identified in other mammals, no elafin ortholog has been found in rats and mice [42].

Although data on WAP proteins and cancer are still emerging, it has been observed that expression of some WAP genes, including SLPI and PI3, as well as WFDC1 and WFDC2, is upregulated or downregulated in cancer, depending on type of cancer (see [43] for a review). The encoded proteins could therefore be useful biomarkers of various cancers. For example, because SLPI is overexpressed in all types of ovarian cancers [44], it has been proposed that measuring SLPI levels in serum could be of help in distinguishing patients with ovarian cancers from those with benign ovarian cysts [45]. Similarly, patients with non-small cell lung carcinoma have elevated levels of SLPI both in their serum and in the tumoral tissues [46]. There is growing evidence that serine protease inhibitors may promote malignancy of cancer cells. Indeed it has been shown by stable transfection of Lewis Lung Carcinoma 3LL-S cells with mouse or human SLPI that overexpression of SLPI significantly increased the malignant potential of 3LL-S cells and that its protease inhibitory capacity was required [47]. On the other hand, SLPI was recently shown to decrease the liver-metastasizing potential of lung carcinoma H-59 cells [48]. From these data, it is clear that much work remains to be done to elucidate the precise role of WAP proteins in carcinogenesis.

3. Inhibitory properties of SLPI and elafin/trappin-2

SLPI inhibits a variety of proteases, including neutrophil elastase and cathepsin G, trypsin, chymotrypsin and chymase (Table 1). Because SLPI was recognized early as a two-domain protein with some sequence similarity to known protease inhibitors, it was suggested that the region 20–29 of domain 1 contained the trypsin-binding site, while the region 72–81 of domain 2 was involved in chymotrypsin and elastase binding [9]. This hypothesis was partially confirmed in 1988 by Grütter et al. [49], who elucidated the 3D structure of a 1:1 chymotrypsin–SLPI complex. The boomerang-like shape of the two-domain SLPI molecule revealed that the P1 and P1' residues for chymotrypsin binding were Leu72 and Met73, but that no protease was complexed with domain 1; as the putative inhibitory loop was not defined in the electron density map no further information could be obtained [49]. A later series of studies on the inhibitory properties of each SLPI domain using chemical modification or mutation of critical residues showed that 1:1 protease binding, including trypsin binding, occurs through domain 2 at P1 = Leu72, while domain 1 is probably not inhibitory [50–52]. This remains somewhat unclear because of the demonstration, by enzymatic and non-enzymatic methods, that the enzyme:inhibitor stoichiometry shifts from

1:1 to 2:1 for cathepsin G, trypsin and chymotrypsin binding at a micromolar concentration of enzyme and inhibitor, but not for elastase binding [53]. Domain 1 has been proposed [54] to help stabilize the elastase–SLPI complex and to mediate heparin binding, which has been shown to increase the rate of elastase inhibition by SLPI, probably as a result of a change in the conformation of the inhibitor [55].

The high affinity of SLPI for neutrophil serine proteases and its high local concentration (about 5 μ M) in the bronchial compartment [56,57] suggests that its main physiological function is to regulate any excess neutrophil serine protease activity in the upper airways, where it could account for 80–90% of the total elastase inhibitory capacity in the sputum [38]. SLPI is thought to be a minor contributor to elastase inhibition in the lower respiratory tract (alveolae) because α 1-PI, a serpin that preferentially targets neutrophil elastase *in vivo*, diffuses from the blood plasma through the alveola–capillary barrier to reach a concentration about three-fold [18] or ten-fold [58,59] higher than that of SLPI in alveolae. Also, SLPI is associated with elastin fibers in the lung [60] and in the skin [61], which suggests that it prevents the proteolysis of elastin. Besides its role in lungs, SLPI is thought to be involved in controlling neutrophil protease-induced proteolysis at sites of inflammation, like mucosal surfaces, where it is produced.

The anti-protease activity of SLPI in mucous fluids may be compromised by proteolytic cleavage by endogenous proteases such as cysteine cathepsins including cathepsins B, L and S [19] or prostate-specific-antigen (human kallikrein 3) [62]. Proteases from pathogenic agents may also cleave the SLPI molecule hence altering its inhibitory properties. This has been demonstrated for protease(s) from *Trichomonas vaginalis* [63], *Staphylococcus aureus* [64], *Pseudomonas aeruginosa* [64] or *Porphyromonas gingivalis* [65]. Oxidation of Met73 in the inhibitory loop [66,67] may also decrease its inhibitory capacity towards its cognate proteases. This may be relevant in chronic lung diseases like cystic fibrosis, pneumonia or chronic obstructive pulmonary disease (COPD), which are all characterized by a protease burden of endogenous origin or bacterial origin and increased oxidative stress.

Elafin and its precursor have a much more restricted spectrum of anti-protease activity since it inhibits only elastases of neutrophil and pancreatic origin and neutrophil proteinase 3 (Table 1). It does not inhibit human tryptase (C. Sommerhoff, personal communication) and, like SLPI, it does not inhibit granzyme [68]. This suggests that the primary function of elafin is to protect tissues from excessive proteolysis due to neutrophil activation and the resulting release of proteases. Despite the low affinity of elafin for stratum corneum chymotryptic enzyme (SCCE), which is also known as human kallikrein 7 (Table 1), some authors propose that elafin could contribute to the control of SCCE activity in desquamation of human skin [69]. The inhibitory activity of trappin-2/pre-elafin was investigated only recently when a recombinant form of the inhibitor became available, although preliminary data obtained with synthetic elafin and trappin-2 suggested that elafin and its precursor have the same inhibitory potency

Table 1
Equilibrium dissociation constants K_i of chelonianin inhibitors for the inhibition of serine proteinases

Protease	K_i (M)		
	Elafin	Trappin-2	SLPI
Human neutrophil elastase	0.8×10^{-10} [72] 1.7×10^{-10} [129]	0.3×10^{-10} [72] 1.0×10^{-10} [76]	0.1×10^{-10} [130] 3×10^{-10} [131] 1.6×10^{-9} [100] 0.6×10^{-10} [54] 1.9×10^{-9} [132] 0.1×10^{-10a}
Human proteinase 3	1.2×10^{-10} [72] 4.2×10^{-10} [40] 9.5×10^{-9} [133]	1.8×10^{-10} [72] 3.6×10^{-10} [76]	1×10^{-6} [133] n.i. [134]
Human cathepsin G	n.i.	n.i.	4.2×10^{-9} [132] 10^{-8} [131] 2×10^{-10a}
Pig pancreatic elastase	7.5×10^{-10} [72] 1×10^{-9} [133]	3.2×10^{-10} [72] 7.8×10^{-10} [76]	10^{-7} (Human PE) [135]
Bovine chymotrypsin	n.i.	n.i.	0.4×10^{-9} [50] 1.3×10^{-9} [100] 2.2×10^{-10} [54] 2.6×10^{-9} [132]
Bovine trypsin	n.i.	n.i.	3×10^{-9} [50] 51×10^{-9} [100]
Pig trypsin	n.i.	n.i.	8.3×10^{-9} [132]
Human mast cell chymase	n.i.	n.i.	50×10^{-9} [136]
Stratum corneum chymotryptic enzyme (human kallikrein 7)	1.6×10^{-6} [137]	n.d.	63×10^{-9} [69]

n.i., no inhibition; n.d., not determined.

^a Unpublished work, Baranger et al.

[70]. Bourbonnais et al. produced His-tagged pre-elafin in *Saccharomyces cerevisiae* and demonstrated that the inhibitory profile of the recombinant molecule was the same as that of purified elafin, with similar half-effective concentrations (EC_{50}) for inhibiting neutrophil elastase [71]. We produced recombinant tag-free trappin-2 in the *Pichia pastoris* expression system in 2004, and provided a detailed kinetic characterization of the interaction of the inhibitor with its target enzymes [72]. We confirmed that trappin-2 and elafin have identical high affinities for neutrophil elastase and proteinase 3, with K_i values in the 10^{-10} molar range (Table 1). Hence, the N-terminal cementoin domain of trappin-2 does not appear to interfere with the protease binding site of the elafin moiety. Elucidation of the 3D structure of elafin complexed with PPE [73] showed that the P1–P1' residues are the Ala24 and Met25 residues within the inhibitory loop (residues Leu20 to Leu26). The fact that an oxidation-sensitive methionyl residue occupies a critical position in the binding loop of elafin/trappin-2 prompted us to investigate the changes in its inhibitory capacity under oxidative conditions, as observed for SLPI [66] and α 1-PI [74], which both have an oxidizable Met in their binding loop. Not surprisingly, we found that using either N-chlorosuccinimide or the myeloperoxidase/ H_2O_2/Cl^- system resulted in the oxidation of the two Met residues of elafin and trappin-2 in methionine sulfoxide with a concomitant decrease in the affinity (about two orders of magnitude) of the oxidized inhibitors for their target proteases [75]. Replacing P1' Met by Leu in elafin (mutant M25L) or trappin-2 (mutant M63L) slightly decreased the affinity of both inhibitors for HNE in both their unoxidized and oxidized forms, while

neither mutant inhibited Pr3 [75]. A recent study on the structure–function relationships of trappin-2 indicated that the inhibitory potential of the M63G mutant is markedly decreased [76]. These findings emphasize the importance of a Met residue at P1 (α 1-PI) or P1' (SLPI or elafin/trappin-2) as a major determinant of the specific inhibition of neutrophil protease by natural inhibitors. Why elafin/trappin-2 do not inhibit cathepsin G and why SLPI does not target proteinase 3 despite their high structural similarities remains puzzling but depending on the protease could originate from unfavorable or favorable electrostatic interactions at the protease–inhibitor interface as assessed from molecular modeling studies (unpublished results).

Like SLPI and many other protease inhibitors, elafin and trappin-2 may be susceptible to proteolytic degradation. We have shown that, *in vitro*, many serine or cysteine proteases but not acid or metallo proteases were able to cleave trappin-2 preferentially in the N-terminal cementoin domain or at the junction between the N-ter domain and the C-ter elafin-containing domain [29]. Elafin, with its four-disulfide core, appeared to be much more resistant to proteolysis in our experimental conditions [29] although Brown et al. [77] reported a high *in vivo* and *ex vivo* sensitivity of elafin to proteolytic inactivation by proteases of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*, which is a common allergen associated with atopic asthma.

In addition to SLPI, elafin/trappin-2 and α 1-PI, other inhibitors of neutrophil serine proteases (elastase, cathepsin G, proteinase 3) may be present in the lungs including the non-specific inhibitor serum α 2-macroglobulin and the serpins α 1-anti-chymotrypsin and MNEI (monocyte/neutrophil

elastase inhibitor). Because it has a high-molecular mass, $\alpha 2$ -macroglobulin is almost undetectable in the normal lung but its concentration increases in lung pathologies such as adult respiratory distress syndrome where it is found complexed to elastase [78]. $\alpha 1$ -anti-chymotrypsin is thought to be the preferential inhibitor of cathepsin G but within the lung of patients with chronic bronchitis and emphysema, it adopts a latent conformation that renders the molecule inactive as an inhibitor [79]. MNEI is an intracellular serpin that is found at high levels in monocytes, neutrophils and macrophages and interacts with elastase, cathepsin G and proteinase 3 via two adjacent reactive inhibitory sites [80]. How the control of neutrophil serine proteases by each of the described inhibitors is performed in normal or pathological conditions is not yet clear even if SLPI, elafin/trappin-2 together with $\alpha 1$ -PI appear to play an essential role in the lung.

4. Anti-HIV-1 activity of SLPI and elafin

Investigation of the selective anti-HIV-1 inhibiting activity of human saliva led to the identification of SLPI as the factor responsible for its anti-HIV-1 activity [81]. As SLPI was active at physiological concentrations, it was suggested that SLPI helps ensure the low rate of oral HIV-1 transmission. Although the mechanism by which SLPI inhibits HIV-1 infection is still unclear, it seems that the anti-viral activity of SLPI is independent of its anti-protease properties and does not result from a direct interaction with the virus but is rather due to an interaction with the host cells [81]. Using the yeast two-hybrid assay, human scramblase, a membrane protein responsible for the movement of membrane phospholipids, was identified as a SLPI-binding protein [82]. It has been suggested that the SLPI–scramblase complex blocks the fusion of HIV-1 virus with the host cell membrane, and so prevents infection [82]. A more recent study has also pointed out that SLPI interferes with virus entry by binding to the phospholipid-binding protein, annexin II, to disrupt the interaction of the human cell-derived phosphatidylserine of the HIV-1 envelope with annexin II [83]. Increased concentrations of SLPI in vaginal fluid seem to be associated with reduced rates of perinatal HIV-1 transmission. It may thus contribute to natural anti-retroviral defenses [84].

As elafin and its precursor, trappin-2, are structurally related to SLPI, having the same four-disulfide core, the question arises as to whether they have similar anti-HIV-1 activities. This question was partly answered by recent findings published in a patent application by a Canadian group. This group used SELDI-TOF mass spectrometry to identify a 6007 Da marker protein from cervical lavage samples whose elevated concentration was correlated with resistance to HIV [85]. This protein was identified as elafin by tandem mass spectrometry and has since been shown to prevent the infection of T-cells by HIV-1 *in vitro*. The exact mechanism of elafin anti-viral activity is not yet known, but it is believed to be due to elafin binding to HIV binding sites at the surface of T-cells. Only elafin, but not trappin-2, was tested despite the misleading title of the patent application [85]. Whether SLPI,

elafin and possibly trappin-2 act in concert at the mucosal surfaces to target the same HIV-1 virus (co)receptor on host cells is not known, but it could be worth investigating. This could reveal details of the unique anti-viral properties of these molecules.

5. Anti-bacterial and anti-fungal activities of SLPI and elafin

Both SLPI and elafin/trappin-2 have anti-microbial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria and are believed to be part of the mucosal host defense system. SLPI is active against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* [86,87], while elafin acts on *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* [70,88,89] but not *E. coli* [88]. The dose-dependent bactericidal activity of SLPI against *S. aureus* and *E. coli* has been attributed to its non-inhibitory N-terminal domain, but the two isolated domains, alone or in combination, are significantly less active than intact SLPI [86]. Like SLPI, the anti-bacterial activities of elafin and its precursor, trappin-2 seem to be independent of their anti-protease activity, as shown by experiments using the N-terminal cementoin domain and the C-terminal domain (elafin). Both domains have significant anti-bacterial effects at low concentrations, but intact trappin-2 is much more effective than the additive effects of the separate domains [70]. The *in vivo* relevance of these *in vitro* findings is based on the observation that a genetically driven increase in elafin in the lungs of mice protected these tissues against the inflammatory damage caused by *Pseudomonas aeruginosa* [89] or *Staphylococcus aureus* [90]. Furthermore, elafin and SLPI expression and secretion are induced in human keratinocytes [88] and in bronchial epithelial cells [30] after exposure to *Pseudomonas aeruginosa*. Together with the fact that they are also expressed in the human endometrium [31], this reinforces the emerging concept that elafin/trappin-2 and SLPI are important as defense molecules in mucosal secretions, in addition to the defensins and cathelicidin families of anti-microbial peptides [42,91]. Interestingly, many WAP-containing proteins that are not protease inhibitors, including eppin [92], mouse SWAM1 and SWAM2 [93] and omwarpin from snake venom [94], also have anti-bacterial activity.

SLPI has a well-characterized fungicidal activity, in addition to its anti-bacterial activities. Tomee et al. showed that SLPI acts against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* isolated from patients, and this action has, like its anti-bacterial activity, been ascribed to the N-terminal domain of SLPI [95]. The fungicidal activity of SLPI is comparable to that of human defensins and human lysozyme. Elafin and trappin-2 are also presumed to have anti-fungal properties because of their structural and functional similarities to SLPI, but no data have been published. We have recently found that elafin and trappin-2 are potent fungicides for *A. fumigatus* and *C. albicans* clinical strains (Baranger et al., unpublished work).

The biochemical mechanisms responsible for the anti-bacterial and anti-fungal activities of WAP proteins, including

SLPI and elafin, are still unclear, but parallels with other anti-microbial peptides suggest that they are due to their cationic nature, which could enable them to destabilize the anionic cell membrane of bacteria. SLPI has a net charge of +12, while elafin and trappin-2 have net charges of +3 and +7, respectively. Mapping the electrostatic potentials over the molecular surface of elafin and SLPI (Fig. 1) shows different patterns of clusters of positive charge that could explain their different anti-bacterial selectivities.

6. SLPI and elafin/trappin-2 as anti-inflammatory proteins

Many studies have shown that SLPI and elafin are anti-inflammatory in such disorders as atherosclerosis, myocardial infarction and lung emphysema, and that this feature is apparently independent of their anti-protease activity (see [42] for a review). Early experiments by Lentsch et al. [96] demonstrated that SLPI prevented the activation of nuclear factor κ B (NF- κ B), a transcription factor that increases the synthesis of several pro-inflammatory mediators, during lung inflammation. And suppression of NF- κ B activation is associated with increase synthesis of NF- κ B inhibiting factor (I κ B β), a key NF- κ B regulator. Recent findings support the initial observations of Lentsch et al., by providing more details on the way SLPI and elafin interfere with the NF- κ B pathway. Evidence from experiments incubating SLPI with peripheral blood monocytes or U937 monocytic cell line demonstrated that SLPI is rapidly taken up by cells and becomes located in the cytoplasm and nucleus [97]. In the cytoplasm, SLPI prevents the degradation of several key NF- κ B activation regulatory proteins, including I κ B α , I κ B β and IRAK (IL-1-receptor-associated kinase), by the ubiquitin-proteasome pathway [98,99] following NF- κ B activation by LPS or LTA (lipoteichoic acid). The SLPI-inhibited degradation of I κ B proteins does not allow their release from the NF- κ B complex, thereby preventing NF- κ B entering the nucleus and activating transcription of pro-inflammatory genes. In the nucleus, SLPI also interferes with the NF- κ B cascade by competing with p65 for binding to the NF- κ B-binding sites in the promoter region of pro-inflammatory genes like IL-8 and TNF- α [97], thus inhibiting their transcription. Although it is not yet clear whether the anti-inflammatory activity of SLPI is strictly dependent on its anti-protease activity, various mutants and oxidized SLPI, which are known to have decreased inhibitory potency, cannot prevent I κ B α / β degradation [99,100].

Not surprisingly, elafin has been demonstrated to exert anti-inflammatory effects by inhibiting activation of transcription factors AP-1 and NF- κ B induced by LPS in the U937 monocytic cells line [101] through a mechanism involving, like SLPI, an inhibitory effect on the ubiquitin-proteasome pathway. Sallenave's group have reported similar findings on the anti-inflammatory effects of full length elafin (trappin-2) and SLPI [102,103]. They also suggested that elafin is involved in the resolution of inflammation by inhibiting the cleavage of macrophage CD14 by HNE, thereby facilitating the phagocytosis of apoptotic leukocytes [104].

SLPI and elafin/trappin-2 are also involved in the response to early inflammation signals, in addition to interfering with the NF- κ B signalling pathway. Both SLPI [105] and elafin/trappin-2 [106] bind bacterial LPS. The biological consequence of the SLPI–LPS interaction is that SLPI inhibits the responses of macrophage to LPS, in part by blocking the transfer of LPS to soluble CD14 and the subsequent uptake of LPS–CD14 complexes by macrophages. Elafin and trappin-2 are also LPS antagonists, but they could have pro-inflammatory effects by replacing LPS-binding protein as a carrier molecule for priming innate immune responses, depending on the extracellular environment [106].

Recent findings also suggest that SLPI [107] and elafin (reviewed in [42]) are involved in the priming of the innate immune response and/or in the modulation of the adaptive immune response. Hence, these two molecules, first identified as anti-proteases, contribute significantly to host defense and to tissue homeostasis, as suggested by the observation that SLPI is important in wound healing [108–110].

7. The unique properties of elafin/trappin-2 as transglutaminase substrates

Trappin-2 has a short domain of 38 amino acids on the N-terminal side of the inhibitory four-disulfide elafin core, which is rich in sequence motifs conforming to the general consensus sequence GQDPVK [26]. Nara et al. searched for sequence homologies with other proteins and found that the sequences of these motifs are very similar to that of the repetitive elements in involucrin, cornifin and the guinea pig seminal vesicle protein SVP-1, which are substrates for transglutaminase(s) [27]. They are all rich in glutamine and lysine residues, although the lengths of the motifs are different (Fig. 1). This feature allows transglutaminase(s) to catalyze the formation of an intermolecular ϵ -(γ -glutamyl)lysine isopeptide bond. It was these sequence similarities that originally led to the hypothesis that trappin-2 could be covalently anchored to extracellular matrix proteins, hence the term “cementoin” for the N-terminal domain of trappin-2 [27]. Tissue-type transglutaminase is able to cross-link trappin-2 to laminin *in vitro* [27], and biotinylated variants of the consensus hexapeptide GQDPVK to various extracellular matrix proteins [26]. There is good evidence that this process is relevant *in vivo*. Western blotting analysis of the molecular sizes of elafin and trappin-2 in tissues showed that the molecular forms detected at higher M_r values than expected were cross-linked elafin or trappin-2 [23,27]. Also, Steinert and Marekov [111] suggested that elafin acts as a cross-bridge protein in the formation of the cornified envelope. Analysis of isolated cross-links derived from the human foreskin stratum corneum revealed that both glutamine and lysine residues of trappin-2 are engaged in isopeptide bonds with loricrin, keratin1 and desmoplakin, accounting for about 6% of all proteins in the cornified cell envelope [111]. This role of elafin/trappin-2 as an important component of the epidermis was confirmed by immunoelectron microscopy [112]. We and others found that trappin-2, and to a lesser extent elafin, are readily covalently bound by a transglutaminase to extracellular

matrix proteins such as laminin [27], fibronectin, β -crystallin, collagen IV, fibrinogen [113], and elastin [114]. We then needed to know whether ECM-bound trappin-2 or elafin can still inhibit HNE and Pr3. We used an enzyme-based assay and surface plasmon resonance to demonstrate that both fibronectin-bound inhibitors retain their inhibitory capacity although the rate constants for association are lower than those of the soluble inhibitors, because of inhibitor immobilization [113]. This suggests that the transglutaminase-mediated targeting of elafin/trappin-2 to soluble or insoluble structures in tissues not only serves a structural function, but also provides local protection from excess proteolysis by neutrophil proteinases. Noteworthy, the elafin orthologs in sheep, TOM-1 and TOM-2, contain 19 or 26 transglutaminase substrate motifs; the biological implications are not known, but there may be a high occurrence of transglutaminase-mediated cross-links [115].

8. Therapeutic potential of SLPI and elafin/trappin-2 for lung diseases

A genetic deficiency of $\alpha 1$ -PI, the major physiological inhibitor of neutrophil elastase, is often associated with inherited emphysema. Hence, it was recognized early on that neutrophil elastase is probably the central player in the development of emphysema, by destroying lung elastin. It is now clear that elastase, and probably its homologue proteases, proteinase 3 and cathepsin G, may be involved in various forms of chronic obstructive pulmonary diseases (COPD), cystic fibrosis, adult respiratory distress syndrome (ARDS), pulmonary fibrosis and asthma. Uncontrolled elastase has several other potent biological activities in addition to its direct deleterious effects on lung tissues. It is a secretagogue for mucin production [116], an activator of matrix metalloproteinases (MMPs) [117], an inactivator of tissue inhibitors of MMPs (TIMPs) [118] and a generator of neutrophil-chemotactic elastin-derived fragments [119]. Although other factors, like other proteases, probably contribute to the lung diseases cited above, anti-protease-based therapies designed to block elastase and/or other neutrophil proteases have emerged over the last decade or so. Indeed, inhaled $\alpha 1$ -PI significantly reduces the elastase-driven destruction of lung tissue in mice exposed to cigarette smoke [120]. Intravenous $\alpha 1$ -PI is much less efficient than inhaled $\alpha 1$ -PI, suggesting that delivering anti-proteases by aerosol is likely to be better for targeting lung tissues. The same holds true for SLPI which has been shown to be rapidly eliminated from the plasma when administered intravenously and degraded as a result of renal metabolism [121]. Aerosolized recombinant SLPI has been evaluated in sheep [122], in healthy patients, and in patients with cystic fibrosis [122,123]. As SLPI has a half-life of about 12 h and does not seem to accumulate in the lungs after aerosolization, it was given twice a day. Notwithstanding the high cost of such treatment, SLPI reduced elastase activity [123] and the concentration of the potent neutrophil chemoattractant, interleukin-8 [124]. Aerosolized SLPI also raised the glutathione concentration in the airways of sheep, thus improving anti-oxidant

protection [122]. However, it has been shown that aerosolized SLPI did not deposit efficiently in poorly ventilated areas in the lungs of patients with cystic fibrosis or emphysema [125]. This may explain why pre-clinical studies with aerosolized SLPI, performed some 15 years ago, have not been followed up.

Elafin and trappin-2 have apparently not yet been evaluated for aerosol-delivery, but their anti-inflammatory properties have been assessed using several models including acute lung injury (ALI) in hamsters [126] and mice [89], LPS-induced inflammation in mice [127] and porcine pancreatic elastase (PPE)-induced emphysema in mice [76,128]. Trappin-2 (pre-elafin) significantly reduced inflammation in all of these models, as assessed by a reduction in the number of neutrophils in bronchoalveolar lavage fluids, a reduction in PPE-induced emphysematous-like lesions, and a reduction in lung hemorrhage. Elafin was compared to trappin-2 in the hamster ALI model and had a much weaker effect than trappin-2 [126], perhaps because of the capacity of trappin-2 to be conjugated to extracellular matrix proteins by tissue transglutaminase. This unique property distinguishes trappin-2 from both $\alpha 1$ -PI and SLPI. Recent findings indicate that the full anti-protease activity of instilled trappin-2 is essential for protecting lung tissue in experimental PPE-induced emphysema [76]. While the proteolytic and biological activities of elastase and other neutrophil serine proteases are attractive therapeutic targets, further studies are required to overcome the practical barriers to aerosol delivery, such as determining the inhibitor dose-response, efficiency of nebulizers and control of the regional distribution of the therapeutic protein in the lungs.

9. Conclusions

SLPI, elafin and its precursor trappin-2 have many biological activities in addition to their well-characterized properties as serine protease inhibitors. They are present at the surface of mucosae, where they probably play key roles both in the onset and in the resolution of inflammation. They are therefore very attractive candidate molecules for use in new aerosol-based therapeutic strategies to treat chronic lung diseases.

Acknowledgments

The authors warmly thank Dr Wolfram Bode (Munich, Germany) for providing the atomic coordinates of the SLPI–chymotrypsin complex. The English text was edited by Dr Owen Parkes.

References

- [1] M. Laskowski Jr., I. Kato, Protein inhibitors of proteinases, *Annu. Rev. Biochem.* 49 (1980) 593–626.
- [2] G.A. Silverman, P.I. Bird, R.W. Carrell, F.C. Church, P.B. Coughlin, P.G. Gettins, J.A. Irving, D.A. Lomas, C.J. Luke, R.W. Moyer, P.A. Pemberton, E. Remold-O'Donnell, G.S. Salvesen, J. Travis, J.C. Whisstock, The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 33293–33296.

- [3] D. Krowarsch, T. Cierpicki, F. Jelen, J. Otlewski, Canonical protein inhibitors of serine proteases, *Cell. Mol. Life Sci.* 60 (2003) 2427–2444.
- [4] N.D. Rawlings, F.R. Morton, A.J. Barrett, MEROPS: the peptidase database, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) D270–D272.
- [5] U. Seemuller, M. Arnhold, H. Fritz, K. Wiedenmann, W. Machleidt, R. Heinzl, H. Appelhans, H.G. Gassen, F. Lottspeich, The acid-stable proteinase inhibitor of human mucous secretions (HUSI-I, antileukoprotease). Complete amino acid sequence as revealed by protein and cDNA sequencing and structural homology to whey proteins and Red Sea turtle proteinase inhibitor, *FEBS Lett.* 199 (1986) 43–48.
- [6] I. Kato, N. Tominaga, Trypsin-subtilisin inhibitor from red sea turtle eggwhite consists of two tandem domains — one Kunitz — one of a new family, *Fed. Proc.* 38 (1979) 832.
- [7] K. Hochstrasser, R. Reichert, S. Schwarz, E. Werle, Isolation and characterisation of a protease inhibitor from human bronchial secretion, *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 353 (1972) 221–226.
- [8] K. Ohlsson, H. Tegner, Inhibition of elastase from granulocytes by the low molecular weight bronchial protease inhibitor, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 36 (1976) 437–445.
- [9] R.C. Thompson, K. Ohlsson, Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83 (1986) 6692–6696.
- [10] S.M. Campbell, J.M. Rosen, L.G. Hennighausen, U. Strech-Jurk, A.E. Sippel, Comparison of the whey acidic protein genes of the rat and mouse, *Nucleic Acids Res.* 12 (1984) 8685–8697.
- [11] T. Kikuchi, T. Abe, S. Hoshi, N. Matsubara, Y. Tominaga, K. Satoh, T. Nukiwa, Structure of the murine secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) gene and chromosomal localization of the human and murine SLPI genes, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19 (1998) 875–880.
- [12] G. Stetler, M.T. Brewer, R.C. Thompson, Isolation and sequence of a human gene encoding a potent inhibitor of leukocyte proteases, *Nucleic Acids Res.* 14 (1986) 7883–7896.
- [13] S. Doumas, A. Kolokotronis, P. Stefanopoulos, Anti-inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor, *Infect. Immun.* 73 (2005) 1271–1274.
- [14] A.E. King, K. Morgan, J.M. Sallenave, R.W. Kelly, Differential regulation of secretory leukocyte protease inhibitor and elafin by progesterone, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310 (2003) 594–599.
- [15] J.M. Sallenave, J. Shulmann, J. Crossley, M. Jordana, J. Gauldie, Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11 (1994) 733–741.
- [16] T.B. McNeely, M. Dealy, D.J. Dripps, J.M. Orenstein, S.P. Eisenberg, S.M. Wahl, Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro, *J. Clin. Invest.* 96 (1995) 456–464.
- [17] D.C. Shugars, A.L. Alexander, K. Fu, S.A. Freel, Endogenous salivary inhibitors of human immunodeficiency virus, *Arch. Oral Biol.* 44 (1999) 445–453.
- [18] C. Vogelmeier, R.C. Hubbard, G.A. Fells, H.P. Schnebli, R.C. Thompson, H. Fritz, R.G. Crystal, Anti-neutrophil elastase defense of the normal human respiratory epithelial surface provided by the secretory leukoprotease inhibitor, *J. Clin. Invest.* 87 (1991) 482–488.
- [19] C.C. Taggart, G.J. Lowe, C.M. Greene, A.T. Mulgrew, S.J. O'Neill, R.L. Levine, N.G. McElvaney, B. Cathepsin, L. and S cleave and inactivate secretory leukoprotease inhibitor, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 33345–33352.
- [20] J. Schalkwijk, A. Chang, P. Janssen, G.J. De Jongh, P.D. Mier, Skin-derived antileukoproteases (SKALPs): characterization of two new elastase inhibitors from psoriatic epidermis, *Br. J. Dermatol.* 122 (1990) 631–641.
- [21] O. Wiedow, J.M. Schroder, H. Gregory, J.A. Young, E. Christophers, Elafin: an elastase-specific inhibitor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 14791–14795.
- [22] J.M. Sallenave, A.P. Ryle, Purification and characterization of elastase-specific inhibitor. Sequence homology with mucus proteinase inhibitor, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 372 (1991) 13–21.
- [23] H.O. Molhuizen, H.A. Alkemade, P.L. Zeeuwen, G.J. de Jongh, B. Wieringa, J. Schalkwijk, SKALP/elafin: an elastase inhibitor from cultured human keratinocytes. Purification, cDNA sequence, and evidence for transglutaminase cross-linking, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 12028–12032.
- [24] T. Saheki, F. Ito, H. Hagiwara, Y. Saito, J. Kuroki, S. Tachibana, S. Hirose, Primary structure of the human elafin precursor preproelafin deduced from the nucleotide sequence of its gene and the presence of unique repetitive sequences in the prosegment, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185 (1992) 240–245.
- [25] J.M. Sallenave, A. Silva, Characterization and gene sequence of the precursor of elafin, an elastase-specific inhibitor in bronchial secretions, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 8 (1993) 439–445.
- [26] P.L. Zeeuwen, W. Hendriks, W.W. de Jong, J. Schalkwijk, Identification and sequence analysis of two new members of the SKALP/elafin and SPAI-2 gene family. Biochemical properties of the transglutaminase substrate motif and suggestions for a new nomenclature, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 20471–20478.
- [27] K. Nara, S. Ito, T. Ito, Y. Suzuki, M.A. Ghoneim, S. Tachibana, S. Hirose, Elastase inhibitor elafin is a new type of proteinase inhibitor which has a transglutaminase-mediated anchoring sequence termed “cementoin”, *J. Biochem.* 115 (1994) 441–448.
- [28] A. Bairoch, P. Bucher, K. Hofmann, The PROSITE database, its status in 1997, *Nucleic Acids Res.* 25 (1997) 217–221.
- [29] N. Guyot, M.L. Zani, P. Berger, S. Dallet-Choisy, T. Moreau, Proteolytic susceptibility of the serine protease inhibitor trappin-2 (pre-elafin): evidence for trypsin-mediated generation of elafin, *Biol. Chem.* 386 (2005) 391–399.
- [30] J.B. Vos, M.A. van Sterkenburg, K.F. Rabe, J. Schalkwijk, P.S. Hiemstra, N.A. Datson, Transcriptional response of bronchial epithelial cells to *Pseudomonas aeruginosa*: identification of early mediators of host defense, *Physiol. Genomics* 21 (2005) 324–336.
- [31] A.E. King, H.O. Critchley, J.M. Sallenave, R.W. Kelly, Elafin in human endometrium: an antiprotease and antimicrobial molecule expressed during menstruation, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88 (2003) 4426–4431.
- [32] R. Pfundt, F. van Ruissen, I.M. van Vlijmen-Willems, H.A. Alkemade, P.L. Zeeuwen, P.H. Jap, H. Dijkman, J. Fransen, H. Croes, P.E. van Erp, J. Schalkwijk, Constitutive and inducible expression of SKALP/elafin provides anti-elastase defense in human epithelia, *J. Clin. Invest.* 98 (1996) 1389–1399.
- [33] G.M. Tremblay, J.M. Sallenave, E. Israel-Assayag, Y. Cormier, J. Gauldie, Elafin/elastase-specific inhibitor in bronchoalveolar lavage of normal subjects and farmer's lung, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154 (1996) 1092–1098.
- [34] J. Schalkwijk, O. Wiedow, S. Hirose, The trappin gene family: proteins defined by an N-terminal transglutaminase substrate domain and a C-terminal four-disulphide core, *Biochem. J.* 340 (1999) 569–577.
- [35] R. Pfundt, M. Wiggins, M. Bergers, M. Zweers, M. Frenken, J. Schalkwijk, TNF-alpha and serum induce SKALP/elafin gene expression in human keratinocytes by a p38 MAP kinase-dependent pathway, *Arch. Dermatol. Res.* 292 (2000) 180–187.
- [36] P.T. Reid, M.E. Marsden, G.A. Cunningham, C. Haslett, J.M. Sallenave, Human neutrophil elastase regulates the expression and secretion of elafin (elastase-specific inhibitor) in type II alveolar epithelial cells, *FEBS Lett.* 457 (1999) 33–37.
- [37] A. Mihaila, G.M. Tremblay, Human alveolar macrophages express elafin and secretory leukocyte protease inhibitor, *Z. Naturforsch.* 56 (2001) 291–297.
- [38] J.M. Sallenave, M. Si Tahar, G. Cox, M. Chignard, J. Gauldie, Secretory leukocyte proteinase inhibitor is a major leukocyte elastase inhibitor in human neutrophils, *J. Leukoc. Biol.* 61 (1997) 695–702.
- [39] M.A. Chowdhury, H. Kuivaniemi, R. Romero, S. Edwin, T. Chaiworapongsa, G. Tromp, Identification of novel functional sequence variants in the gene for peptidase inhibitor 3, *BMC Med. Genet.* 7 (2006) 49.

- [40] Q.L. Ying, S.R. Simon, Kinetics of the inhibition of proteinase 3 by elafin, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 24 (2001) 83–89.
- [41] A. Clauss, H. Lilja, A. Lundwall, A locus on human chromosome 20 contains several genes expressing protease inhibitor domains with homology to whey acidic protein, *Biochem. J.* 368 (2002) 233–242.
- [42] S.E. Williams, T.I. Brown, A. Roghanian, J.M. Sallenave, SLPI and elafin: one glove, many fingers, *Clin. Sci. (Lond.)* 110 (2006) 21–35.
- [43] D. Bouchard, D. Morisset, Y. Bourbonnais, G.M. Tremblay, Proteins with whey-acidic-protein motifs and cancer, *Lancet Oncol.* 7 (2006) 167–174.
- [44] C.D. Hough, K.R. Cho, A.B. Zonderman, D.R. Schwartz, P.J. Morin, Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer, *Cancer Res.* 61 (2001) 3869–3876.
- [45] S. Tsukishiro, N. Suzumori, H. Nishikawa, A. Arakawa, K. Suzumori, Use of serum secretory leukocyte protease inhibitor levels in patients to improve specificity of ovarian cancer diagnosis, *Gynecol. Oncol.* 96 (2005) 516–519.
- [46] S. Ameshima, T. Ishizaki, Y. Demura, Y. Imamura, I. Miyamori, H. Mitsuhashi, Increased secretory leukoprotease inhibitor in patients with non-small cell lung carcinoma, *Cancer* 89 (2000) 1448–1456.
- [47] N. Devoogdt, G. Hassanzadeh Ghassabeh, J. Zhang, L. Brys, P. De Baetselier, H. Revets, Secretory leukocyte protease inhibitor promotes the tumorigenic and metastatic potential of cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 5778–5782.
- [48] N. Wang, T. Thuraisingam, L. Fallavollita, A. Ding, D. Radzioch, P. Brodt, The secretory leukocyte protease inhibitor is a type 1 insulin-like growth factor receptor-regulated protein that protects against liver metastasis by attenuating the host proinflammatory response, *Cancer Res.* 66 (2006) 3062–3070.
- [49] M.G. Grutter, G. Fendrich, R. Huber, W. Bode, The 2.5 Å X-ray crystal structure of the acid-stable proteinase inhibitor from human mucous secretions analysed in its complex with bovine alpha-chymotrypsin, *EMBO J* 7 (1988) 345–351.
- [50] S.P. Eisenberg, K.K. Hale, P. Heimdal, R.C. Thompson, Location of the protease-inhibitory region of secretory leukocyte protease inhibitor, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 7976–7981.
- [51] J.A. Kramps, C. van Twisk, H. Appelhans, B. Meckelein, T. Nikiforov, J.H. Dijkman, Proteinase inhibitory activities of antileukoprotease are represented by its second COOH-terminal domain, *Biochim. Biophys. Acta* 1038 (1990) 178–185.
- [52] B. Meckelein, T. Nikiforov, A. Clemen, H. Appelhans, The location of inhibitory specificities in human mucus proteinase inhibitor (MPI): separate expression of the COOH-terminal domain yields an active inhibitor of three different proteinases, *Protein Eng* 3 (1990) 215–220.
- [53] C. Boudier, J.G. Bieth, The proteinase: mucus proteinase inhibitor binding stoichiometry, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 4370–4375.
- [54] Q.L. Ying, M. Kemme, S.R. Simon, Functions of the N-terminal domain of secretory leukoprotease inhibitor, *Biochemistry* 33 (1994) 5445–5450.
- [55] B. Faller, K. Frommherz, J.G. Bieth, Heparin interferes with the inhibition of neutrophil elastase by its physiological inhibitors, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 373 (1992) 503–508.
- [56] J.A. Kramps, C. Franken, J.H. Dijkman, ELISA for quantitative measurement of low-molecular-weight bronchial protease inhibitor in human sputum, *Am. Rev. Respir. Dis.* 129 (1984) 959–963.
- [57] J.M. Tournier, J. Jacquot, P. Sadoul, J.G. Bieth, Noncompetitive enzyme immunoassay for the measurement of bronchial inhibitor in biological fluids, *Anal. Biochem.* 131 (1983) 345–350.
- [58] I. Kouchi, S. Yasuoka, Y. Ueda, T. Ogura, Analysis of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in bronchial secretions from patients with hypersecretory respiratory diseases, *Tokushima J. Exp. Med.* 40 (1993) 95–107.
- [59] J.A. Kramps, C. Franken, J.H. Dijkman, Quantity of anti-leukoprotease relative to alpha 1-proteinase inhibitor in peripheral airspaces of the human lung, *Clin. Sci. (Lond.)* 75 (1988) 351–353.
- [60] J.A. Kramps, A.H. Te Boekhorst, J.A. Fransen, L.A. Ginsel, J.H. Dijkman, Antileukoprotease is associated with elastin fibers in the extracellular matrix of the human lung. An immunoelectron microscopic study, *Am. Rev. Respir. Dis.* 140 (1989) 471–476.
- [61] M. Wingens, B.H. van Bergen, P.S. Hiemstra, J.F. Meis, I.M. van Vlijmen-Willems, P.L. Zeeuwen, J. Mulder, H.A. Kramps, F. van Ruissen, J. Schalkwijk, Induction of SLPI (ALP/HUSI-1) in epidermal keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.* 111 (1998) 996–1002.
- [62] K. Ohlsson, A. Bjartell, H. Lilja, Secretory leukocyte protease inhibitor in the male genital tract: PSA-induced proteolytic processing in human semen and tissue localization, *J. Androl.* 16 (1995) 64–74.
- [63] D. Draper, W. Donohoe, L. Mortimer, R.P. Heine, Cysteine proteases of *Trichomonas vaginalis* degrade secretory leukocyte protease inhibitor, *J. Infect. Dis.* 178 (1998) 815–819.
- [64] M. Sponer, H.P. Nick, H.P. Schnebli, Different susceptibility of elastase inhibitors to inactivation by proteinases from *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 372 (1991) 963–970.
- [65] T. Into, M. Inomata, Y. Kanno, T. Matsuyama, M. Machigashira, Y. Izumi, T. Imamura, M. Nakashima, T. Noguchi, K. Matsushita, Arginine-specific gingipains from *Porphyromonas gingivalis* deprive protective functions of secretory leukocyte protease inhibitor in periodontal tissue, *Clin. Exp. Immunol.* 145 (2006) 545–554.
- [66] C. Boudier, J.G. Bieth, Oxidized mucus proteinase inhibitor: a fairly potent neutrophil elastase inhibitor, *Biochem. J.* 303 (1) (1994) 61–68.
- [67] C. Boudier, M. Cadene, J.G. Bieth, Inhibition of neutrophil cathepsin G by oxidized mucus proteinase inhibitor. Effect of heparin, *Biochemistry* 38 (1999) 8451–8457.
- [68] G.M. Tremblay, A.M. Wolbink, Y. Cormier, C.E. Hack, Granzyme activity in the inflamed lung is not controlled by endogenous serine proteinase inhibitors, *J. Immunol.* 165 (2000) 3966–3969.
- [69] C.W. Franzke, A. Baici, J. Bartels, E. Christophers, O. Wiedow, Antileukoprotease inhibits stratum corneum chymotryptic enzyme. Evidence for a regulative function in desquamation, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 21886–21890.
- [70] A.J. Simpson, A.I. Maxwell, J.R. Govan, C. Haslett, J.M. Sallenave, Elafin (elastase-specific inhibitor) has anti-microbial activity against gram-positive and gram-negative respiratory pathogens, *FEBS Lett.* 452 (1999) 309–313.
- [71] Y. Bourbonnais, C. Larouche, G.M. Tremblay, Production of full-length human pre-elafin, an elastase specific inhibitor, from yeast requires the absence of a functional yapsin 1 (Yps1p) endoprotease, *Protein Expr. Purif.* 20 (2000) 485–491.
- [72] M.L. Zani, S.M. Nobar, S.A. Lacour, S. Lemoine, C. Boudier, J.G. Bieth, T. Moreau, Kinetics of the inhibition of neutrophil proteinases by recombinant elafin and pre-elafin (trappin-2) expressed in *Pichia pastoris*, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 2370–2378.
- [73] M. Tsunemi, Y. Matsuura, S. Sakakibara, Y. Katsube, Crystal structure of an elastase-specific inhibitor elafin complexed with porcine pancreatic elastase determined at 1.9 Å resolution, *Biochemistry* 35 (1996) 11570–11576.
- [74] C. Taggart, D. Cervantes-Laurean, G. Kim, N.G. McElvaney, N. Wehr, J. Moss, R.L. Levine, Oxidation of either methionine 351 or methionine 358 in alpha 1-antitrypsin causes loss of anti-neutrophil elastase activity, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 27258–27265.
- [75] S.M. Nobar, M.L. Zani, C. Boudier, T. Moreau, J.G. Bieth, Oxidized elafin and trappin poorly inhibit the elastolytic activity of neutrophil elastase and proteinase 3, *FEBS J* 272 (2005) 5883–5893.
- [76] A. Doucet, D. Bouchard, M.F. Janelle, A. Bellemare, S. Gagne, G.M. Tremblay, Y. Bourbonnais, Characterization of human pre-elafin mutants: full antipeptidase activity is essential to preserve lung tissue integrity in experimental emphysema, *Biochem. J.* 405 (2007) 455–463.
- [77] A. Brown, K. Farmer, L. MacDonald, N. Kalsheker, D. Pritchard, C. Haslett, J. Lamb, J.M. Sallenave, House dust mite Der p 1 downregulates defenses of the lung by inactivating elastase inhibitors, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29 (2003) 381–389.
- [78] M.D. Wewers, D.J. Herzyk, J.E. Gadek, Alveolar fluid neutrophil elastase activity in the adult respiratory distress syndrome is complexed to alpha-2-macroglobulin, *J. Clin. Invest.* 82 (1988) 1260–1267.
- [79] W.S. Chang, D.A. Lomas, Latent alpha1-antichymotrypsin. A molecular explanation for the inactivation of alpha1-antichymotrypsin in chronic bronchitis and emphysema, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 3695–3701.

- [80] J. Cooley, T.K. Takayama, S.D. Shapiro, N.M. Schechter, E. Remold-O'Donnell, The serpin MNEI inhibits elastase-like and chymotrypsin-like serine proteases through efficient reactions at two active sites, *Biochemistry* 40 (2001) 15762–15770.
- [81] T.B. McNeely, D.C. Shugars, M. Rosendahl, C. Tucker, S.P. Eisenberg, S.M. Wahl, Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by secretory leukocyte protease inhibitor occurs prior to viral reverse transcription, *Blood* 90 (1997) 1141–1149.
- [82] C.C. Tseng, C.P. Tseng, Identification of a novel secretory leukocyte protease inhibitor-binding protein involved in membrane phospholipid movement, *FEBS Lett.* 475 (2000) 232–236.
- [83] G. Ma, T. Greenwell-Wild, K. Lei, W. Jin, J. Swisher, N. Hardegen, C.T. Wild, S.M. Wahl, Secretory leukocyte protease inhibitor binds to annexin II, a cofactor for macrophage HIV-1 infection, *J. Exp. Med.* 200 (2004) 1337–1346.
- [84] K. Pillay, A. Coutosoudis, A.K. Agadzi-Naqvi, L. Kuhn, H.M. Coovadia, E.N. Janoff, Secretory leukocyte protease inhibitor in vaginal fluids and perinatal human immunodeficiency virus type 1 transmission, *J. Infect. Dis.* 183 (2001) 653–656.
- [85] Ball, T.B., Iqbal, S.M., Plummer, F.A., Trappin-2 (elafin) inhibits HIV, Patent, International publication number WO2006122404, 2006.
- [86] P.S. Hiemstra, R.J. Maassen, J. Stolk, R. Heinzel-Wieland, G.J. Steffens, J.H. Dijkman, Antibacterial activity of antileukoprotease, *Infect. Immun.* 64 (1996) 4520–4524.
- [87] O. Wiedow, J. Harder, J. Bartels, V. Streit, E. Christophers, Antileuko-protease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248 (1998) 904–909.
- [88] U. Meyer-Hoffert, N. Wichmann, L. Schwichtenberg, P.C. White, O. Wiedow, Supernatants of *Pseudomonas aeruginosa* induce the *Pseudomonas*-specific antibiotic elafin in human keratinocytes, *Exp. Dermatol.* 12 (2003) 418–425.
- [89] A.J. Simpson, W.A. Wallace, M.E. Marsden, J.R. Govan, D.J. Porteous, C. Haslett, J.M. Sallenave, Adenoviral augmentation of elafin protects the lung against acute injury mediated by activated neutrophils and bacterial infection, *J. Immunol.* 167 (2001) 1778–1786.
- [90] J.W. McMichael, A.I. Maxwell, K. Hayashi, K. Taylor, W.A. Wallace, J.R. Govan, J.R. Dorin, J.M. Sallenave, Antimicrobial activity of murine lung cells against *Staphylococcus aureus* is increased in vitro and in vivo after elafin gene transfer, *Infect. Immun.* 73 (2005) 3609–3617.
- [91] M.P. Rogan, P. Geraghty, C.M. Greene, S.J. O'Neill, C.C. Taggart, N.G. McElvaney, Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence, *Respir. Res.* 7 (2006) 29.
- [92] S. Yenugu, R.T. Richardson, P. Sivashanmugam, Z. Wang, M.G. O'Rand, F.S. French, S.H. Hall, Antimicrobial activity of human EPPIN, an androgen-regulated, sperm-bound protein with a whey acidic protein motif, *Biol. Reprod.* 71 (2004) 1484–1490.
- [93] K. Hagiwara, T. Kikuchi, Y. Endo, K. HuqunUsui, M. Takahashi, N. Shibata, T. Kusakabe, H. Xin, S. Hoshi, M. Miki, N. Inooka, Y. Tokue, T. Nukiwa, Mouse SWAM1 and SWAM2 are antibacterial proteins composed of a single whey acidic protein motif, *J. Immunol.* 170 (2003) 1973–1979.
- [94] D.G. Nair, B.G. Fry, P. Alewood, P.P. Kumar, R.M. Kini, Antimicrobial activity of omwiprin, a new member of the wiprin family of snake venom proteins, *Biochem. J.* 402 (2007) 93–104.
- [95] J.F. Tomee, P.S. Hiemstra, R. Heinzel-Wieland, H.F. Kauffman, Anti-leukoprotease: an endogenous protein in the innate mucosal defense against fungi, *J. Infect. Dis.* 176 (1997) 740–747.
- [96] A.B. Lentsch, J.A. Jordan, B.J. Czermak, K.M. Diehl, E.M. Younkin, V. Sarma, P.A. Ward, Inhibition of NF-kappaB activation and augmentation of IkappaBbeta by secretory leukocyte protease inhibitor during lung inflammation, *Am. J. Pathol.* 154 (1999) 239–247.
- [97] C.C. Taggart, S.A. Cryan, S. Weldon, A. Gibbons, C.M. Greene, E. Kelly, T.B. Low, S.J. O'Neill, N.G. McElvaney, Secretory leucoprotease inhibitor binds to NF-kappaB binding sites in monocytes and inhibits p65 binding, *J. Exp. Med.* 202 (2005) 1659–1668.
- [98] C.M. Greene, N.G. McElvaney, S.J. O'Neill, C.C. Taggart, Secretory leucoprotease inhibitor impairs Toll-like receptor 2- and 4-mediated responses in monocytic cells, *Infect. Immun.* 72 (2004) 3684–3687.
- [99] C.C. Taggart, C.M. Greene, N.G. McElvaney, S. O'Neill, Secretory leucoprotease inhibitor prevents lipopolysaccharide-induced IkappaBalpha degradation without affecting phosphorylation or ubiquitination, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 33648–33653.
- [100] M.S. Mulligan, A.B. Lentsch, M. Huber-Lang, R.F. Guo, V. Sarma, C.D. Wright, T.R. Ulich, P.A. Ward, Anti-inflammatory effects of mutant forms of secretory leukocyte protease inhibitor, *Am. J. Pathol.* 156 (2000) 1033–1039.
- [101] M.W. Butler, I. Robertson, C.M. Greene, S.J. O'Neill, C.C. Taggart, N.G. McElvaney, Elafin prevents lipopolysaccharide-induced AP-1 and NF-kappaB activation via an effect on the ubiquitin-proteasome pathway, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 34730–34735.
- [102] P.A. Henriksen, M. Hitt, Z. Xing, J. Wang, C. Haslett, R.A. Riemersma, D.J. Webb, Y.V. Kotelevtsev, J.M. Sallenave, Adenoviral gene delivery of elafin and secretory leukocyte protease inhibitor attenuates NF-kappa B-dependent inflammatory responses of human endothelial cells and macrophages to atherogenic stimuli, *J. Immunol.* 172 (2004) 4535–4544.
- [103] J.M. Sallenave, G.A. Cunningham, R.M. James, G. McLachlan, C. Haslett, Regulation of pulmonary and systemic bacterial lipopolysaccharide responses in transgenic mice expressing human elafin, *Infect. Immun.* 71 (2003) 3766–3774.
- [104] P.A. Henriksen, A. Devitt, Y. Kotelevtsev, J.M. Sallenave, Gene delivery of the elastase inhibitor elafin protects macrophages from neutrophil elastase-mediated impairment of apoptotic cell recognition, *FEBS Lett.* 574 (2004) 80–84.
- [105] A. Ding, N. Thieblemont, J. Zhu, F. Jin, J. Zhang, S. Wright, Secretory leukocyte protease inhibitor interferes with uptake of lipopolysaccharide by macrophages, *Infect. Immun.* 67 (1999) 4485–4489.
- [106] J.W. McMichael, A. Roghanian, L. Jiang, R. Ramage, J.M. Sallenave, The antimicrobial antiprotease elafin binds to lipopolysaccharide and modulates macrophage responses, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 32 (2005) 443–452.
- [107] W. Xu, B. He, A. Chiu, A. Chadburn, M. Shan, M. Buldys, A. Ding, D.M. Knowles, P.A. Santini, A. Cerutti, Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI, *Nat. Immunol.* 8 (2007) 294–303.
- [108] N. Angelov, N. Moutsopoulos, M.J. Jeong, S. Nares, G. Ashcroft, S.M. Wahl, Aberrant mucosal wound repair in the absence of secretory leukocyte protease inhibitor, *Thromb. Haemostasis* 92 (2004) 288–297.
- [109] G.S. Ashcroft, K. Lei, W. Jin, G. Longenecker, A.B. Kulkarni, T. Greenwell-Wild, H. Hale-Donze, G. McGrady, X.Y. Song, S.M. Wahl, Secretory leukocyte protease inhibitor mediates non-redundant functions necessary for normal wound healing, *Nat. Med.* 6 (2000) 1147–1153.
- [110] J. Zhu, C. Nathan, W. Jin, D. Sim, G.S. Ashcroft, S.M. Wahl, L. Lacomis, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, C.D. Wright, A. Ding, Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair, *Cell* 111 (2002) 867–878.
- [111] P.M. Steinert, L.N. Marekov, The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isopeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 17702–17711.
- [112] H. Nakane, A. Ishida-Yamamoto, H. Takahashi, H. Iizuka, Elafin, a secretory protein, is cross-linked into the cornified cell envelopes from the inside of psoriatic keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.* 119 (2002) 50–55.
- [113] N. Guyot, M.L. Zani, M.C. Maurel, S. Dallet-Choisy, T. Moreau, Elafin and its precursor trappin-2 still inhibit neutrophil serine proteinases when they are covalently bound to extracellular matrix proteins by tissue transglutaminase, *Biochemistry* 44 (2005) 15610–15618.
- [114] J. Muto, K. Kuroda, H. Wachi, S. Hirose, S. Tajima, Accumulation of elafin in actinic elastosis of sun-damaged skin: elafin binds to elastin and prevents elastolytic degradation, *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007) 1358–1366.
- [115] T.I. Brown, R. Mistry, D.D. Collie, S. Tate, J.M. Sallenave, Trappin ovine molecule (TOM), the ovine ortholog of elafin, is an acute phase reactant in the lung, *Physiol. Genomics* 19 (2004) 11–21.
- [116] H.P. Hauber, S.C. Foley, Q. Hamid, Mucin overproduction in chronic inflammatory lung disease, *Can. Respir. J.* 13 (2006) 327–335.

- [117] P. Shamamian, J.D. Schwartz, B.J. Pocock, S. Monea, D. Whiting, S.G. Marcus, P. Mignatti, Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: a role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis, *J. Cell. Physiol.* 189 (2001) 197–206.
- [118] Y. Okada, S. Watanabe, I. Nakanishi, J. Kishi, T. Hayakawa, W. Watorek, J. Travis, H. Nagase, Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases by neutrophil elastase and other serine proteinases, *FEBS Lett.* 229 (1988) 157–160.
- [119] G.W. Hunninghake, J.M. Davidson, S. Rennard, S. Szapiel, J.E. Gadek, R.G. Crystal, Elastin fragments attract macrophage precursors to diseased sites in pulmonary emphysema, *Science* 212 (1981) 925–927.
- [120] P.A. Pemberton, D. Kobayashi, B.J. Wilk, J.M. Henstrand, S.D. Shapiro, P.J. Barr, Inhaled recombinant alpha 1-antitrypsin ameliorates cigarette smoke-induced emphysema in the mouse, *COPD* 3 (2006) 101–108.
- [121] M. Bergenfeldt, P. Bjork, K. Ohlsson, The elimination of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) after intravenous injection in dog and man, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 50 (1990) 729–737.
- [122] C. Vogelmeier, A. Gillissen, R. Buhl, Use of secretory leukoprotease inhibitor to augment lung antineutrophil elastase activity, *Chest* 110 (1996) 261S–266S.
- [123] N.G. McElvaney, B. Doujaiji, M.J. Moan, M.R. Burnham, M.C. Wu, R.G. Crystal, Pharmacokinetics of recombinant secretory leukoprotease inhibitor aerosolized to normals and individuals with cystic fibrosis, *Am. Rev. Respir. Dis.* 148 (1993) 1056–1060.
- [124] N.G. McElvaney, H. Nakamura, P. Birrer, C.A. Hebert, W.L. Wong, M. Alphonso, J.B. Baker, M.A. Catalano, R.G. Crystal, Modulation of airway inflammation in cystic fibrosis. In vivo suppression of interleukin-8 levels on the respiratory epithelial surface by aerosolization of recombinant secretory leukoprotease inhibitor, *J. Clin. Invest.* 90 (1992) 1296–1301.
- [125] J. Stolk, J. Camps, H.I. Feitsma, J. Hermans, J.H. Dijkman, E.K. Pauwels, Pulmonary deposition and disappearance of aerosolised secretory leukocyte protease inhibitor, *Thorax* 50 (1995) 645–650.
- [126] G.M. Tremblay, E. Vachon, C. Larouche, Y. Bourbonnais, Inhibition of human neutrophil elastase-induced acute lung injury in hamsters by recombinant human pre-elafin (trappin-2), *Chest* 121 (2002) 582–588.
- [127] E. Vachon, Y. Bourbonnais, C.D. Bingle, S.J. Rowe, M.F. Janelle, G.M. Tremblay, Anti-inflammatory effect of pre-elafin in lipopolysaccharide-induced acute lung inflammation, *Biol. Chem.* 383 (2002) 1249–1256.
- [128] M.F. Janelle, A. Doucet, D. Bouchard, Y. Bourbonnais, G.M. Tremblay, Increased local levels of granulocyte colony-stimulating factor are associated with the beneficial effect of pre-elafin (SKALP/trappin-2/WAP3) in experimental emphysema, *Biol. Chem.* 387 (2006) 903–909.
- [129] Q.L. Ying, S.R. Simon, Kinetics of the inhibition of human leukocyte elastase by elafin, a 6-kilodalton elastase-specific inhibitor from human skin, *Biochemistry* 32 (1993) 1866–1874.
- [130] F. Gauthier, U. Fryksmark, K. Ohlsson, J.G. Bieth, Kinetics of the inhibition of leukocyte elastase by the bronchial inhibitor, *Biochim. Biophys. Acta.* 700 (1982) 178–183.
- [131] C.D. Wright, J.A. Kennedy, R.J. Zitnik, M.A. Kashem, Inhibition of murine neutrophil serine proteinases by human and murine secretory leukocyte protease inhibitor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254 (1999) 614–617.
- [132] C.E. Smith, D.A. Johnson, Human bronchial leucocyte proteinase inhibitor. Rapid isolation and kinetic analysis with human leucocyte proteinases, *Biochem. J.* 225 (1985) 463–472.
- [133] O. Wiedow, J. Ludemann, B. Utecht, E. Christophers, Inhibition of proteinase 3 activity by peptides derived from human epidermis, *Adv. Exp. Med. Biol.* 336 (1993) 61–64.
- [134] N.V. Rao, B.C. Marshall, B.H. Gray, J.R. Hoidal, Interaction of secretory leukocyte protease inhibitor with proteinase-3, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 8 (1993) 612–616.
- [135] H.O. Hakansson, K. Ohlsson, Influence of plasma proteinase inhibitors and the secretory leukocyte proteinase inhibitor on pancreatic elastase-induced degradation of some plasma proteins, *Gastroenterol. Jpn.* 27 (1992) 652–656.
- [136] M. Walter, M. Plotnick, N.M. Schechter, Inhibition of human mast cell chymase by secretory leukocyte proteinase inhibitor: enhancement of the interaction by heparin, *Arch. Biochem. Biophys.* 327 (1996) 81–88.
- [137] C.W. Franzke, A. Baici, E. Christophers, O. Wiedow, in: V.K. Hopsu-Havu, M. Jarvinen, K. Kirschke (Eds.), *Proteolysis in Cell Functions*, IOS Press, Amsterdam, 1997, pp. 438–446.

Développement d'inhibiteurs polyvalents des protéases à sérine de neutrophile dérivés de l'élaïne, du SLPI et de la trappine-2 (Publication n°2).

I. Contexte de l'étude

Les NSPs sont impliquées dans les pathologies inflammatoires pulmonaires et le contrôle de leur activité enzymatique peut être une stratégie thérapeutique anti-inflammatoire intéressante. Seuls le SLPI et l' α 1-PI ont été utilisés en thérapie anti-inflammatoire chez l'homme dans le cadre de pathologies pulmonaires (Hubbard *et al.*, 1989a, b, c ; McElvaney *et al.*, 1993). L'administration de ces inhibiteurs par aérosol a permis d'augmenter leur efficacité au niveau pulmonaire. Le rétablissement de la balance protéase/anti-protéase a permis de diminuer l'état inflammatoire général. Ces inhibiteurs sont de très bons inhibiteurs d'HNE mais le SLPI inhibe aussi la CatG et l' α 1-PI inhibe la Pr3. Dans ces différentes expériences, seul le contrôle de l'activité de l'HNE soluble a été évalué.

Lors de l'activation des neutrophiles, une partie des NSPs reste fixée à la surface des neutrophiles. Une étude réalisée au laboratoire a montré que l' α 1-PI et le SLPI pouvaient inhiber l'élastase liée aux membranes (Korkmaz *et al.*, 2005). En revanche, Owen *et al.* ont montré que l'élaïne n'inhibe que faiblement la Pr3 membranaire (Owen *et al.*, 2003). L'inhibition de l'HNE, de la Pr3 et de la CatG liées aux membranes des neutrophiles par l'élaïne, la T2 et le SLPI, respectivement, n'a pas été testée à ce jour.

Les propriétés anti-inflammatoires de l'élaïne et de la T2 font de ces inhibiteurs de nouveaux candidats potentiels pour une utilisation en thérapie anti-inflammatoire. Les propriétés de transglutamination de la T2 confèrent à cet inhibiteur un intérêt particulier pour une administration par aérosol. En effet, la T2 fixée aux protéines de la matrice extracellulaire par transglutamination, reste inhibitrice de l'HNE et de la Pr3 (Guyot *et al.*, 2005b). La fixation de cet inhibiteur permettrait de limiter son élimination et ainsi d'améliorer le temps et l'efficacité de l'inhibition.

Le but de cette étude est de développer de nouveaux inhibiteurs polyvalents, à partir des structures de l'élaïne, de la T2 et du SLPI, c'est-à-dire capables d'inhiber les trois NSPs à la fois sous leur forme soluble et liée aux membranes de neutrophiles, tout en conservant leurs propriétés de transglutamination.

II. Méthodologie

Pour le développement de ces inhibiteurs polyvalents, deux stratégies ont été adoptées. La première consiste à coupler le domaine 2 du SLPI, inhibiteur de l'HNE et de la CatG, au domaine élafine, inhibiteur de l'HNE et de la Pr3 pour concevoir des chimères (SLPI2-Elaf et Elaf-SLPI2) retenant les propriétés inhibitrices de chaque domaine. La seconde consiste en la mutation de différents acides aminés de la boucle inhibitrice de la T2 par ceux situés, à la même position, dans la boucle inhibitrice du SLPI (T2 A62L et T2 R60Q/A62L/R69F) (Figure 31, Publication^{°2}).

En parallèle de ces différents inhibiteurs polyvalents, nous avons développé deux autres inhibiteurs appelés CemSLPI₂ et CemAQSPLI₂. Le CemSLPI₂ correspond à la fusion du domaine cémentoïne de la T2 et du second domaine du SLPI, inhibiteur d'HNE et de CatG. Le CemAQSPLI₂ possède, en plus du domaine cémentoïne, les deux premiers acides aminés du domaine élafine (AQ), dont une Gln impliquée dans la réaction de transglutamination *in vivo* (Steinert et Marekov, 1995). Ces inhibiteurs pourraient être administrés par aérosol sous forme d'un cocktail d'inhibiteurs avec de la T2, en vue d'une thérapie anti-inflammatoire, pour inhiber les trois NSPs (**Résultats complémentaires**).

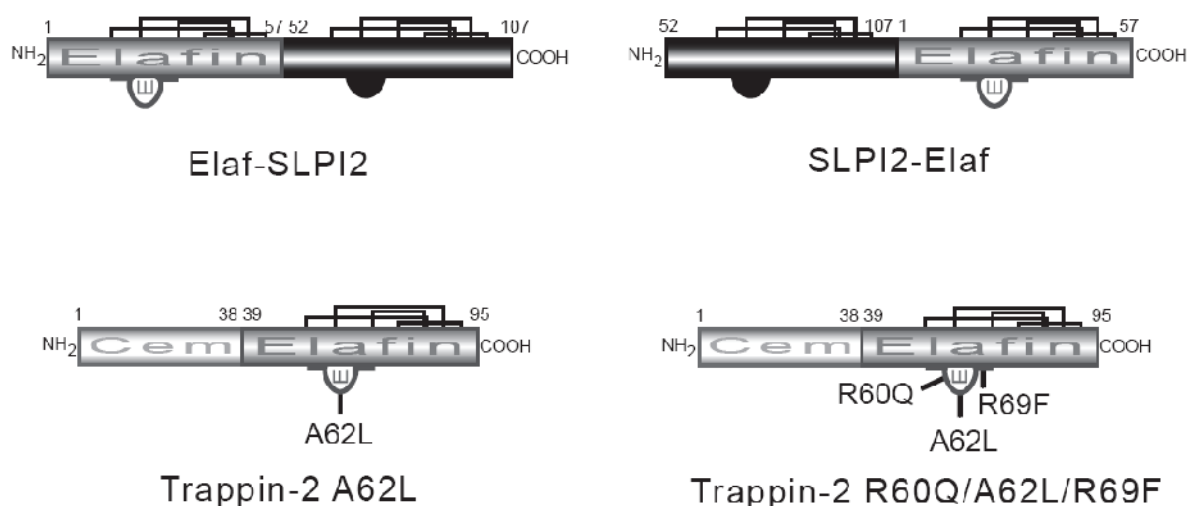


Figure 31 : Représentation schématique des différents inhibiteurs produits dans cette étude. D'après Zani *et al.* (Publication n°2).

A. Les chimères SLPI2-Elaf et Elaf-SLPI2

Toutes les PCR et les fusions décrites dans cet article sont effectuées avec une ADN polymérase haute fidélité (Taq/Pwo) (Roche). Nous avons utilisé le même protocole de

construction et de production des inhibiteurs que celui décrit précédemment pour l'inhibiteur T2 A62D/M63L. Les amorces C1 et C4 (Tableau XI) ont permis d'amplifier, à partir du plasmide pGE-SKA-B/K contenant l'ADNc codant pour la trappine-2, la séquence codant pour l'élafine et celle codant pour les six premiers acides aminés du domaine 2 du SLPI (DTPNPT). Les amorces C3 et C2 ont permis d'amplifier, à partir du plasmide pRH 1811 contenant l'ADNc codant pour le SLPI, la séquence codant pour le domaine 2 du SLPI et celle codant pour les six derniers acides aminés de l'élafine (ACFVPQ). Les deux produits de PCR ont été fusionnés puis amplifiés par les amorces C1 (forward) et C2 (reverse) pour obtenir l'ADNc codant pour Elaf-SLPI2. Cet ADNc a ensuite été cloné dans le vecteur pPIC9 puis séquencé. Nous avons procédé de la même façon pour obtenir l'ADNc SLPI2-Elaf en utilisant les amorces C5, C6, C7 et C8 (Tableau XI).

Primers	Sequences
L1 SLPI1(Elaf)-SLPI2	5'-TTGAATCCCCCTAACCGCTGCCAGAGTGAAGTGGCAG-3'
L2 SLPI1(Elaf)-SLPI2	5'-CGAGCGGCCGCGGAATCAAGCTTTCACAGC-3'
L3 SLPI1(Elaf)-SLPI2	5'-CGACTCGAGAAAAGATCTGGAAAGTCCTCAAAGCTGGAGTCTGTCCATTATCTTGATC-3'
L4 SLPI1(Elaf)-SLPI2	5'-GCGGTTAGGGGGATTCAACATGGCGCACCGGATCAAGATAATGGGACAGACTCCAGCTTT-3'
L5 SLPI1(Elaf)-SLPI2	5'-CGACTCGAGAAAAGATCTG-3'
L6 SLPI1(Elaf)-SLPI2	5'-GCGGTTAGGGGGATTCAAC-3'
C1 Elaf-SLPI2	5'-CGACTCGAGAAAAGAGCGCAAGAGCCAGTCAA-3'
C2 Elaf-SLPI2	5'-CGAGCGGCCGCGGAATCAAGCTTTCACAGG-3'
C3 Elaf-SLPI2	5'-GCCTGTTTTGTTTCCCCAGGACACCCCAAACCCAACA-3'
C4 Elaf-SLPI2	5'-TGTTGGGTTTGGGGTGTCTTGGGGAACGAAACAGGC-3'
C5 Elaf-SLPI2	5'-CGACTCGAGAAAAGGGATCCTGTTGACACCCC-3'
C6 Elaf-SLPI2	5'-CGAGCGGCCGCGCCTCTCACTGGGGAAC-3'
C7 Elaf-SLPI2	5'-TGCGTTTCCCCTGTGAAAGTCAAAGGTCCAGTCTCC-3'
C8 Elaf-SLPI2	5'-GGAGACTGGACCTTTGACTTTCACAGGGGAAACGCA-3'
T1 Trappin-2 A62L	5'-CGACTCGAGAAAAGAGCTGTCACGGGAGTTCCT-3'
T2 Trappin-2 A62L	5'-ATCCGGTGCCTCATGTTGAATC-3'
T3 Trappin-2 A62L	5'-GATTCAACATGAGGCACCGGAT-3'
T4 Trappin-2 A62L	5'-CGAGCGGCCGCCCCCTCTCACTGGGGAAC-3'
T5 Trappin-2 A62L/R69F	5'-TCCCCCTAACTTCTGCTTGAAG-3'
T6 Trappin-2 A62L/R69F	5'-TTTCAAGCAGAAGTTAGGGGGA-3'
T7 Trappin-2 R60Q/A62L/R69F	5'-ATCTTGATCCAGTGCCTCATG-3'
T8 Trappin-2 R60Q/A62L/R69F	5'-CATGAGGCACTGGATCAAGAT-3'

Tableau XII : Amorces de mutagenèse utilisées pour réaliser les différents inhibiteurs décrits dans la publication n°2. Les sites de coupure des enzymes *XhoI* (CTCGAG) et *NotI* (GCGGCCGC) sont soulignés.

B. T2 A62L et T2 R60Q/A62L/R69F

A partir du plasmide pGE-SKA-B/K contenant l'ADNc codant la trappine-2, les amorces T1 et T2 ont permis d'amplifier la partie N-terminale de la T2 contenant la boucle inhibitrice avec la mutation (Ala62Leu). La partie C-terminale de la T2 contenant la même mutation a été amplifiée avec les amorces T3 et T4. Le produit de fusion a été amplifié avec les amorces T1 (forward) et T4 (reverse) pour obtenir l'ADNc codant la T2 A62L. Cet ADNc a été cloné dans le vecteur pPIC9 et a servi de base pour construire les mutants T2 A62L/R69F et T2 R60Q/A62L/R69F. Pour obtenir les ADNc codant la T2 A62L/R69F et la T2 R60Q/A62L/R69F, nous avons procédé de la même façon que pour la T2 A62L en utilisant les amorces T1, T4, T5 et T6 et les amorces T1, T4, T7 et T8 respectivement.

III. Résultats

A. Propriétés inhibitrices vis-à-vis des protéases solubles

Les chimères Elaf-SLPI2 (chimère 1) et SLPI2-Elaf (chimère 2) interagissent fortement avec les trois NSPs puisque les valeurs de K_i déterminées sont de l'ordre de 10^{-11} M ce qui signifie que ces inhibiteurs sont d'excellents inhibiteurs polyvalents des trois NSPs (Tableau XII). Les valeurs de K_i déterminées vis-à-vis de l'HNE sont similaires à celles obtenues avec les inhibiteurs sauvages : l'élaïne et le SLPI. Les expériences de titration de ces inhibiteurs ont confirmé que deux molécules d'HNE sont capables de se fixer sur une molécule de chimère. Elaf-SLPI2 semble être un meilleur inhibiteur de Pr3 que SLPI2-Elaf avec une valeur de K_i 1,5 fois inférieure et 3,5 fois supérieure, respectivement, par rapport à celle obtenue avec l'élaïne. En revanche, les deux chimères semblent être de meilleurs inhibiteurs de la CatG que le SLPI avec une valeur de K_i 5 fois (chimère 1) et 7 fois (chimère 2) inférieure par rapport à celle obtenue avec le SLPI. Nous avons observé qu'une seule mutation dans la boucle inhibitrice de la T2 permet d'inhiber les trois NSPs. En effet la T2 A62L inhibe les trois NSPs. Cet inhibiteur présente une valeur de K_i similaire à celle obtenue avec la T2 vis-à-vis de l'HNE ($1,5 \cdot 10^{-11}$ M et $3 \cdot 10^{-11}$ M, respectivement) mais des valeurs de K_i de l'ordre du nanomolaire : $3,7 \cdot 10^{-9}$ M et $6,4 \cdot 10^{-9}$ M pour la Pr3 et la CatG, respectivement. En revanche la T2 R60Q/A62L/R69F, qui présente une triple mutation dans la boucle inhibitrice, ne possède pas de meilleures propriétés inhibitrices par rapport à la T2 A62L. Bien que les valeurs de K_i vis-à-vis de l'HNE et de la CatG soient trois et deux fois inférieures à celles obtenues avec la T2 A62L, le triple mutant n'inhibe pas la Pr3.

	HNE		Pr3		CatG		PPE	
	K_i (M)	k_{ass} (M ⁻¹ s ⁻¹)	K_i (M)	k_{ass} (M ⁻¹ s ⁻¹)	K_i (M)	k_{ass} (M ⁻¹ s ⁻¹)	K_i (M)	k_{ass} (M ⁻¹ s ⁻¹)
Elafine	8.10^{-11a}	$3.7.10^{6a}$	12.10^{-11a}	$3.3.10^{6a}$	n.s.i.		$0.75.10^{-9a}$	n.d.
Trappine-2	3.10^{-11a}	$3.6.10^{6a}$	18.10^{-11a}	2.10^{6a}	n.s.i.		$0.32.10^{-9a}$	n.d.
SLPI	$1.8.10^{-11}$	5.10^7	n.s.i.		20.10^{-11}	3.10^7	$\geq 50.10^{-9}$	n.d.
ElafSLPI2	$2.2.10^{-11}$	8.10^7	$7.6.10^{-11}$	6.10^7	$3.9.10^{-11}$	4.10^7	$6.4.10^{-9}$	n.d.
SLPI2-Elaf	$5.2.10^{-11}$	1.10^8	$4.3.10^{-11}$	5.10^7	$2.8.10^{-11}$	5.10^7	4.10^{-9}	n.d.
Trappine-2 A62L	$1.5.10^{-11}$	2.10^8	$3.7.10^{-9b}$	3.10^8	$6.4.10^{-9}$	2.10^7	20.10^{-9}	n.d.
Trappine-2 R61Q/A62L/R67F	$0.56.10^{-11}$	1.10^8	n.s.i.		$3.2.10^{-9}$	2.10^7	$\geq 20.10^{-9}$	n.d.

Tableau XIII : Comparaison des valeurs de K_i et de k_{ass} obtenues avec l'élafine, la trappine-2, le SLPI et les différents mutants vis-à-vis des protéases à sérine de neutrophiles. n.s.i.: no significant inhibition ; n.d.: not determined. ^a : d'après Zani *et al.*, 2004. D'après Zani *et al.* (Publication n°2).

B. Inhibition des protéases liées aux membranes des neutrophiles

En plus des enzymes solubles, nous avons également testé ces nouveaux inhibiteurs, ainsi que les molécules d'origine (SLPI, élafine, T2), vis-à-vis des protéases liées aux membranes des neutrophiles. Pour cela, nous avons purifié des neutrophiles, à partir du sang de donneurs volontaires sains, selon le protocole décrit par Attucci *et al.* (Attucci *et al.*, 2002). Les neutrophiles ont ensuite été activés avec du ionophore calcique A23187 puis centrifugés pour séparer le surnageant contenant la fraction soluble des protéases libérées des neutrophiles activés avec les trois protéases affichées aux membranes. Le culot cellulaire est resuspendu dans le tampon d'activité des trois protéases (Hépès 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,4) de façon à mesurer l'activité enzymatique des protéases liées en présence ou non d'inhibiteurs à l'aide des trois substrats spécifiques.

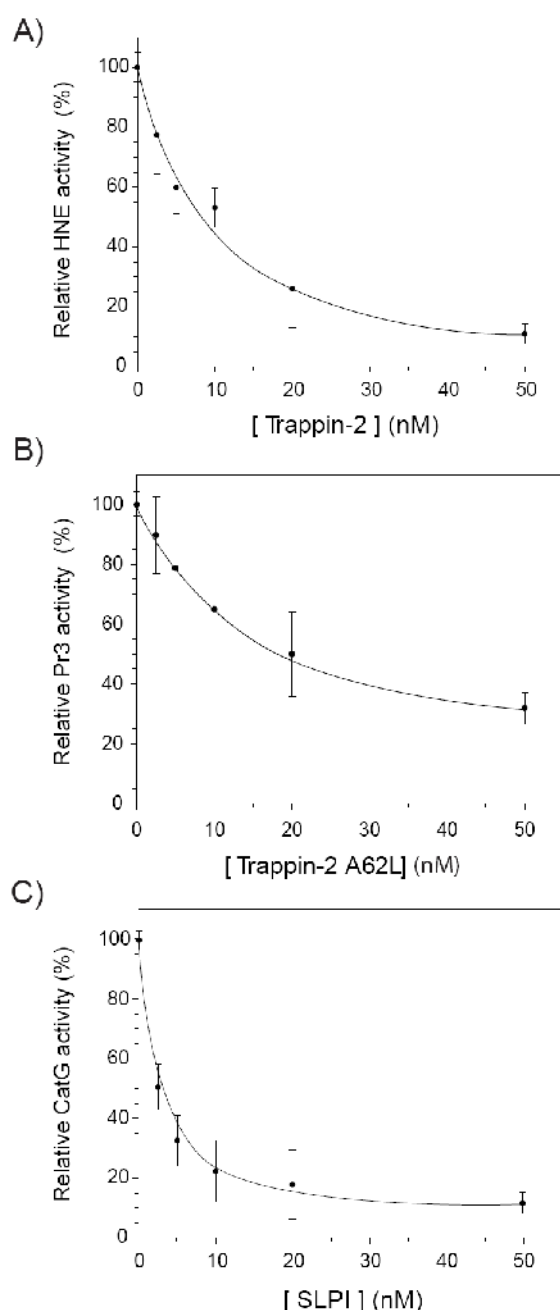


Figure 32 : Courbe d'inhibition des NSPs liées aux membranes en fonction de la concentration en inhibiteur. Inhibition de l'HNE (A), de la Pr3 (B) et de la CatG (C) liées aux membranes par la T2, la T2 A62L et le SLPI respectivement. Les inhibiteurs ont été incubés pendant 15 minutes aux concentrations indiquées. D'après Zani *et al.* (Publication n°2).

Bien que les résultats concernant l'inhibition des protéases liées aux membranes soient controversés dans la littérature, nous avons montré que nos inhibiteurs sont capables d'inhiber ces protéases et que l'inhibition est dépendante de la concentration en inhibiteur (Figure 32). Pour ces expériences, le nombre de neutrophiles a été ajusté de façon à obtenir, pour chaque protéase, une activité enzymatique membranaire d'environ 2 nM.

L'élafine et la T2, comme on pouvait s'y attendre, inhibent l'HNE et la Pr3 membranaires mais pas la CatG. De même, le SLPI inhibe l'HNE et la CatG mais pas la Pr3 membranaires. A 100 nM, ces trois inhibiteurs inhibent l'activité HNE à 90% environ. L'élafine et la T2 inhibent la Pr3 à 70% et le SLPI inhibe la CatG à 90%. Les chimères 1 et 2 ainsi que la T2 A62L inhibent les trois NSPs liées aux membranes avec des pourcentages d'inhibition de 70 à 95% pour une concentration d'inhibiteur de 100 nM (Figure 33).

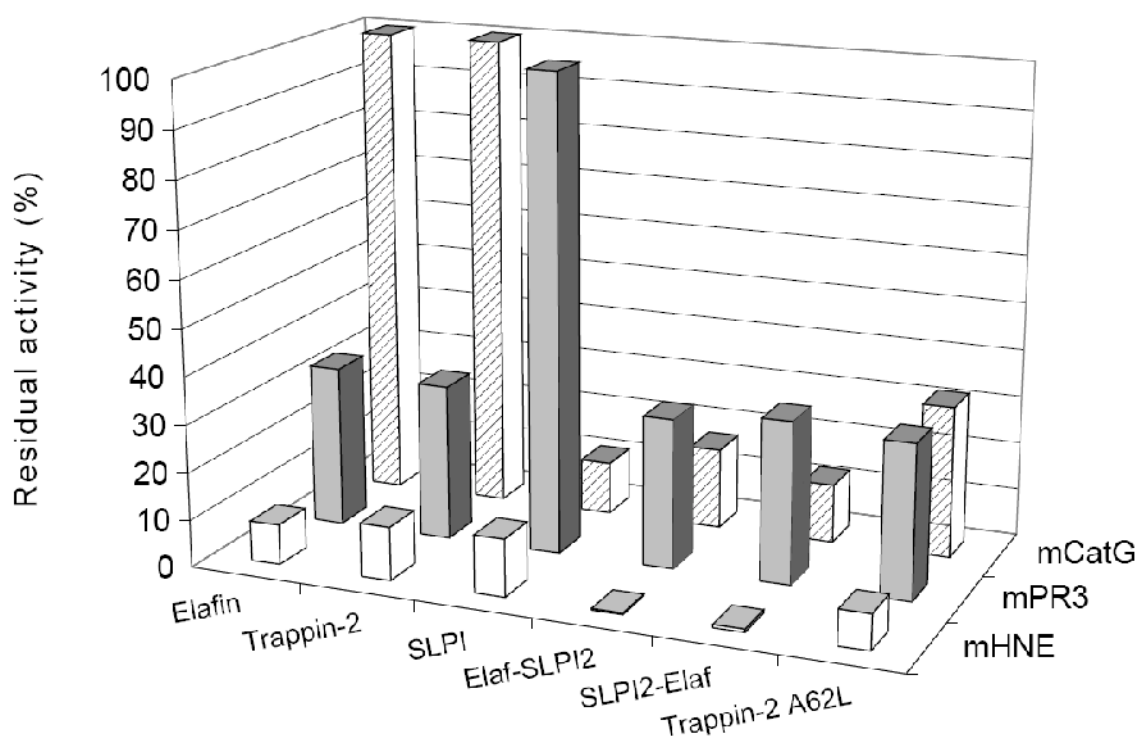


Figure 33 : Inhibition des trois NSPs liées aux membranes par l'élafine, la T2 et le SLPI sauvages ainsi que par leurs dérivés Elaf-SLPI2, SLPI2-Elaf et T2 A62L à une concentration de 100 nM. Les enzymes ont été incubées pendant 15 minutes avec les inhibiteurs. D'après Zani *et al.* (Publication n°2).

Il est à noter que l'inhibition des NSPs liées aux membranes va dépendre de deux paramètres importants : l'affinité des inhibiteurs pour les protéases et la répartition des inhibiteurs sur chacune des trois protéases dont la concentration est variable. En effet, l'élafine, la T2 et le SLPI peuvent se fixer, dans nos conditions, sur deux des trois protéases

alors que les inhibiteurs polyvalents comme les chimères et la T2 A62L peuvent se fixer sur les trois. Dans nos expériences, l'activité enzymatique d'une seule protéase est mesurée à la fois, grâce à l'utilisation de substrats spécifiques, bien que les inhibiteurs peuvent se fixer sur les autres enzymes.

C. Inhibition des protéases solubles par les inhibiteurs fixés à la fibronectine et à l'élastine par transglutamination

Une étude réalisée au laboratoire a montré qu'une fois fixées à la fibronectine, l'élafine et la T2 restent inhibiteurs de l'HNE et de la Pr3 (Guyot *et al.*, 2005b). Nous avons testé si les inhibiteurs polyvalents, les chimères et la T2 A62L, sont capables de se lier à la fibronectine sous l'action d'une transglutaminase tissulaire, la TGase2.

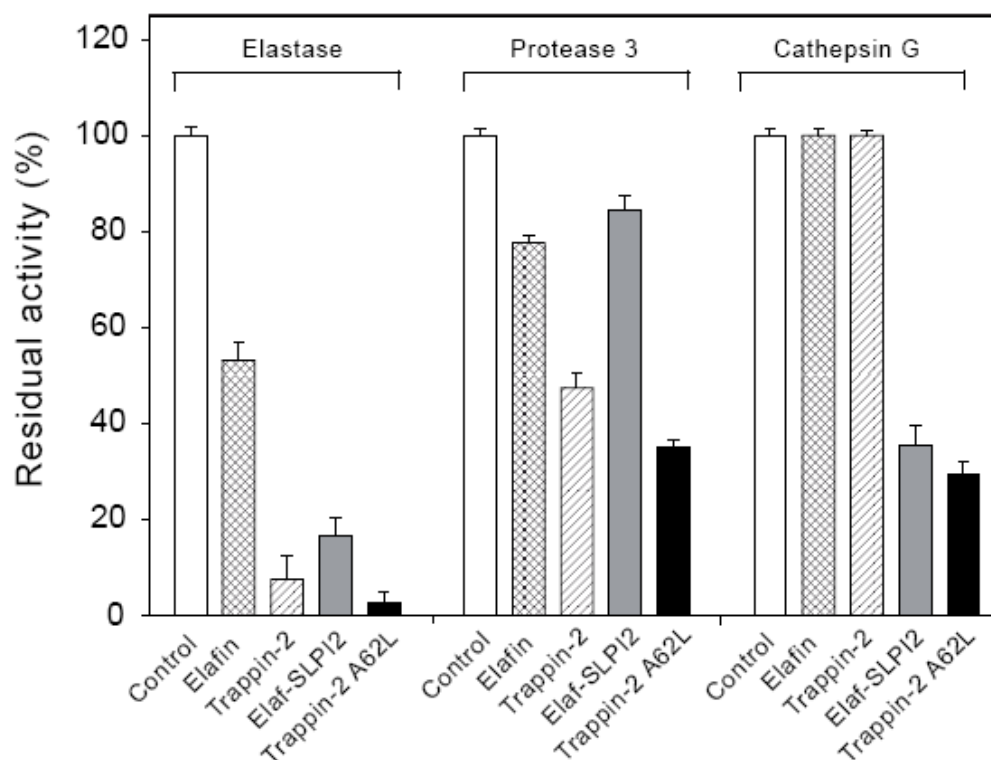


Figure 34 : Inhibition des trois NSPs par l'élafine, la T2, Elaf-SLPI2 et la T2 A62L liés à la fibronectine par transglutamination. Contrôle : sans inhibiteur, [HNE] : 1 nM ; [Pr3] : 2 nM ; [CatG] : 2 nM ; [Inhibiteurs] : 10^{-6} M. Les enzymes ont été incubées pendant 15 minutes avec les inhibiteurs. D'après Zani *et al.* (Publication n°2).

Ces trois inhibiteurs sont capables de se lier à la fibronectine, sous l'action de la TGase2, et restent inhibiteurs des trois protéases (Figure 34). Il est tout de même à noter que la T2 A62L, qui possède le domaine cémentoïne de la T2 sauvage, se fixe beaucoup mieux,

sur la fibronectine, que les chimères qui ne possèdent que deux sites potentiels de transglutamination, la séquence AQEPVK en N-terminal et la Gln terminale de l'élafine.

Dans les mêmes conditions, nous avons observé que nos inhibiteurs sont capables de se fixer sur l'élastine. Les trois NSPs sont moins inhibées lorsque les inhibiteurs sont fixés sur l'élastine (Figure 35), ce qui suggère que la quantité d'inhibiteur lié à l'élastine est moins grande qu'avec la fibronectine.

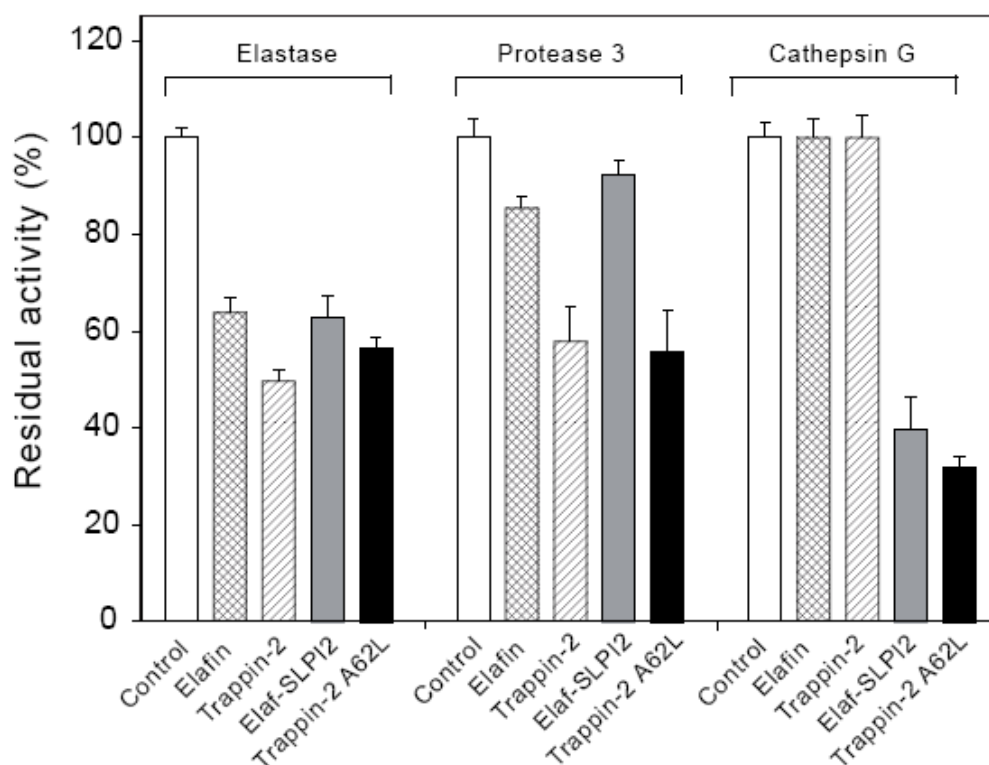


Figure 35 : Inhibition des trois NSPs par l'élafine, la T2, Elaf-SLPI2 et la T2 A62L liés à l'élastine par transglutamination. Contrôle : sans inhibiteur, [HNE] : 1 nM ; [Pr3] : 2 nM ; [CatG] : 2 nM ; [Inhibiteurs] : 10^{-6} M. Les enzymes ont été incubées pendant 15 minutes avec les inhibiteurs. D'après Zani *et al.* (Publication n°2).

IV. Résultats complémentaires

A. Inhibition des protéases d'*A.fumigatus* par le SLPI et la T2 A62L

Nous avons montré dans notre étude précédente que la T2 pouvait inhiber une ou des protéases d'*A. fumigatus* et ainsi limiter la dégradation de la fibronectine (Baranger *et al.*, 2008). Nous avons comparé l'activité inhibitrice du SLPI et de la T2 A62L, par rapport à celle de la T2, vis-à-vis de cette activité protéolytique dans le surnageant de culture d'*A. fumigatus* (aspergillose). De plus, nous avons également testé l'efficacité de ces différents inhibiteurs

sur l'activité protéolytique dans le surnageant de culture d'une autre souche d'*A. fumigatus*, isolée d'un patient atteint de mucoviscidose (Figure 36).

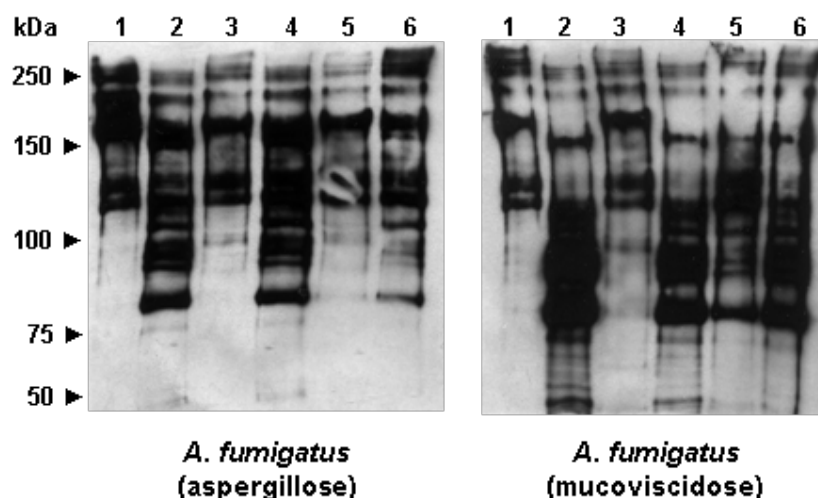


Figure 36 : Effet de différents inhibiteurs sur la dégradation de la fibronectine par les surnageants de culture de deux souches d'*A. fumigatus* isolées d'un patient neutropénique atteint d'aspergillose pulmonaire et d'un patient atteint de mucoviscidose. 1 : fibronectine native, 2 : fibronectine+surnageant de culture (15µL), 3 : fibronectine+surnageant de culture (15µL)+T2 (10^{-7} M), 4 : fibronectine+surnageant de culture (15µL)+T2 A62D/M63L (10^{-7} M), 5 : fibronectine+surnageant de culture (15µL)+T2 A62L (10^{-7} M), 6 : fibronectine+surnageant de culture (15µL)+SLPI (10^{-7} M).

Nous avons observé que la fibronectine est dégradée par des protéases présentes dans le surnageant de culture d'*A. fumigatus*. Cette activité protéolytique, dans les surnageants, ne semble pas être identique. La T2 A62L, comme la T2, inhibe la dégradation de la fibronectine par le surnageant de culture d'*A. fumigatus* (aspergillose) mais semble être moins efficace vis-à-vis du surnageant de culture de la souche d'*A. fumigatus* (mucoviscidose). Le SLPI inhibe légèrement la dégradation de la fibronectine par *A. fumigatus* (aspergillose) mais pas ou peu l'activité protéolytique d'*A. fumigatus* (mucoviscidose). Ces résultats impliquent que la T2 et la T2 A62L pourraient jouer un rôle important dans le contrôle des infections par *A. fumigatus*. Les activités fongicides et inhibitrices de protéase de ces inhibiteurs pourraient participer au contrôle de la dissémination de ces pathogènes opportunistes.

B. CemSLPI₂ et CemAQLSPI₂, des inhibiteurs d'HNE et de CatG capables de se lier à la fibronectine sous l'action de la TGase2

En parallèle des inhibiteurs polyvalents décrits dans l'article, nous avons développé une autre stratégie pour inhiber les trois NSPs. Nous avons produit des inhibiteurs d'HNE et de CatG, capables de se fixer aux protéines de la matrice extracellulaire par

transglutamination. Ces inhibiteurs possèdent le domaine cémentoïne de la T2 et le second domaine du SLPI, inhibiteur de l'HNE et de la CatG. Ces inhibiteurs appelés CemSLPI₂ et CemAQLPI₂, pourraient être administrés par aérosol sous forme d'un cocktail d'inhibiteurs avec la T2, en vue d'une thérapie anti-inflammatoire, pour inhiber les trois NSPs.

1. Production de CemSLPI₂ et CemAQLPI₂

Nous avons produit deux inhibiteurs : le CemSLPI₂ et le CemAQLPI₂. Le CemAQLPI₂ possède en plus du domaine cémentoïne de la T2, les deux premiers acides aminés du domaine élaïne (Ala et Gln) dont la Gln identifiée comme site de transglutamination dans la T2 (Steinert et Marekov, 1995). Ces deux inhibiteurs ont été obtenus par fusion de gène et produits dans la levure *P. pastoris* selon le même protocole que celui utilisé pour produire la T2. Nous avons utilisé les amorces suivantes :

Cem forward :

5'-CGACTCGAGAAAAGAGCTGTCACGGGAGTTCCT-3'

SLPI₂ reverse :

5'-CGAGCGGCCGCGGAATCAAGCTTTCACAGG-3'

Fusion Cem-SLPI₂ forward :

5'-TAAAGGTCAAGTCAAAGATCCTGTTGACCCCA-3'

Fusion Cem-SLPI₂ reverse :

5'-TGGGGTGTCAACAGGATCTTTGACTTTATCTTGACCTTTA-3'

Fusion CemAQ-SLPI₂ forward :

5'-CAAGATAAAGTCAAAGCGCAAGATCCCGTTGACACCCC-3'

Fusion CemAQ-SLPI₂ reverse :

5'-GGGGTGTCAACAGGATCTTGCGCTTTGACTTTGACTTTATCTTG-3'

Après purification de ces deux inhibiteurs (Figure 37, A), nous avons testé leur capacité à former des conjugués par transglutamination. Comme observé pour la T2 et la T2 A62L, ces deux inhibiteurs sont également substrats de transglutaminase (Figure 37, B).

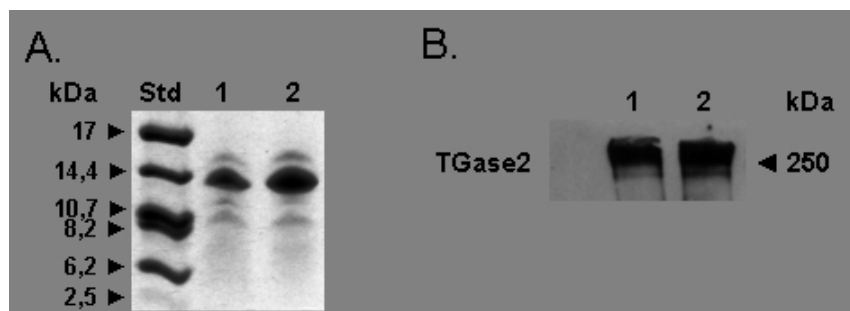


Figure 37 : A. Electrophorèse SDS-PAGE haute résolution des protéines CemSLPI₂ (1) et CemAQLSLPI₂ (2) après purification par FPLC. B. Fixation de CemSLPI₂ (1) et CemAQLSLPI₂ (2) sur la fibronectine par la TGase2. Les complexes fibronectine/inhibiteurs ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE 10% puis détectés avec des anticorps anti-SLPI.

2. Détermination des propriétés inhibitrices de ces deux inhibiteurs

Nous avons déterminé les valeurs de K_i de ces deux inhibiteurs vis-à-vis de l'HNE et de la CatG dans les mêmes conditions que pour la T2 A62L et le SLPI (Publication n°2).

Les valeurs de K_i obtenues pour le CemSLPI₂ vis-à-vis de l'HNE et de la CatG sont identiques à celles obtenues pour le CemAQLSLPI₂ (Tableau XIII). Ces valeurs de K_i sont du même ordre que celles obtenues avec le SLPI natif et le domaine 2 du SLPI. Le domaine cémentoïne ne semble pas influencer l'activité inhibitrice de ces deux inhibiteurs vis-à-vis de ces deux protéases.

K_i (M)	SLPI	CemSLPI ₂	CemAQLSLPI ₂	SLPI ₂
HNE	$1,8 \cdot 10^{-11}$	$2,7 \cdot 10^{-11}$	$2,8 \cdot 10^{-11}$	$5 \cdot 10^{-11}$
CatG	$2 \cdot 10^{-10}$	$7 \cdot 10^{-10}$	$2,6 \cdot 10^{-10}$	$2,6 \cdot 10^{-10}$

Taleau XIV : Valeurs de K_i obtenues pour le SLPI, CemSLPI₂, CemAQLSLPI₂ et SLPI₂ vis-à-vis de l'HNE et de la CatG.

3. Inhibition de l'HNE et de la CatG liées aux membranes des neutrophiles par CemSLPI₂ et CemAQLSLPI₂

Comme pour les différents inhibiteurs décrits dans cette étude, nous avons testé l'efficacité du CemSLPI₂ et du CemAQLSLPI₂ pour inhiber les protéases liées aux membranes des neutrophiles (Figure 38).

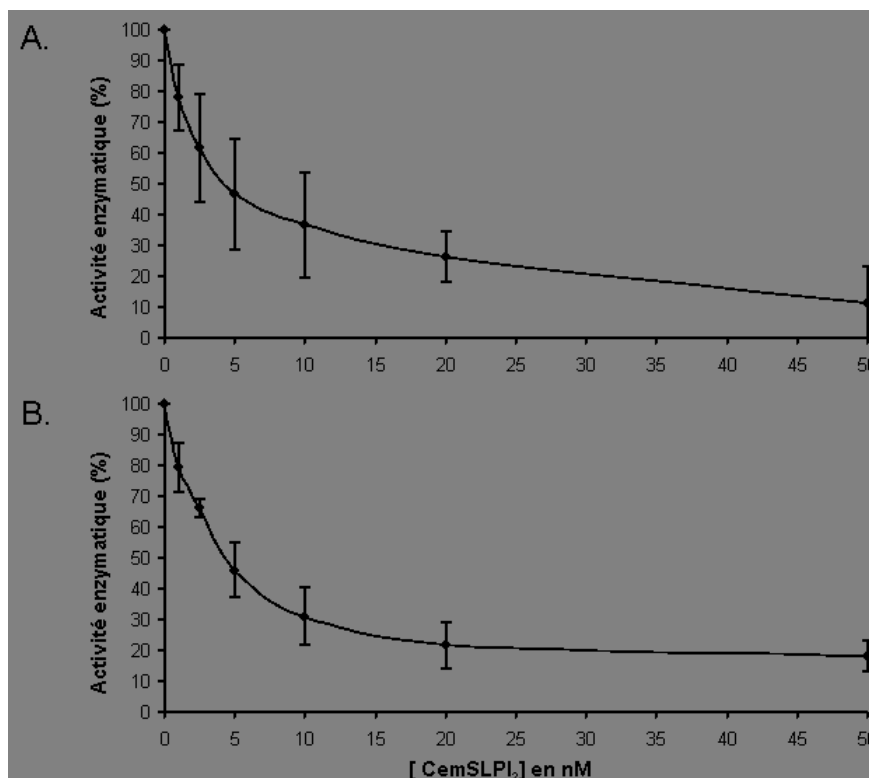


Figure 38 : Inhibition de l'HNE (A) et de la CatG (B) liées aux membranes des neutrophiles par CemSLPI₂. Ces expériences ont été réalisées en parallèle et dans les mêmes conditions que celles réalisées avec le SLPI (Publication n°2).

Les résultats obtenus sont identiques pour les deux inhibiteurs. CemSLPI₂ et CemaQSLPI₂ inhibent aussi bien l'HNE et la CatG liées aux membranes que le SLPI. Comme pour le SLPI, à 100 nM, ces deux inhibiteurs inhibent l'activité HNE à 95% et l'activité CatG à 90%.

4. Inhibition de l'HNE par CemSLPI₂ et CemaQSLPI₂ liés à la fibronectine par la TGase2

Comme pour la T2, nous avons testé l'efficacité de ces deux inhibiteurs pour inhiber l'HNE lorsqu'ils sont liés à la fibronectine par la TGase2. Les deux inhibiteurs transglutaminés sont capables d'inhiber l'HNE de manière dose-dépendante (Figure 39). Il est à noter que le CemaQSLPI₂ semble être un meilleur inhibiteur que le CemSLPI₂. Cette différence d'activité inhibitrice pourrait s'expliquer par le fait que le CemaQSLPI₂, grâce à la Gln supplémentaire, serait un meilleur substrat de transglutaminase que le CemSLPI₂. L'étude de la fixation de ces deux inhibiteurs sur l'élastine et l'inhibition de la CatG est en cours.

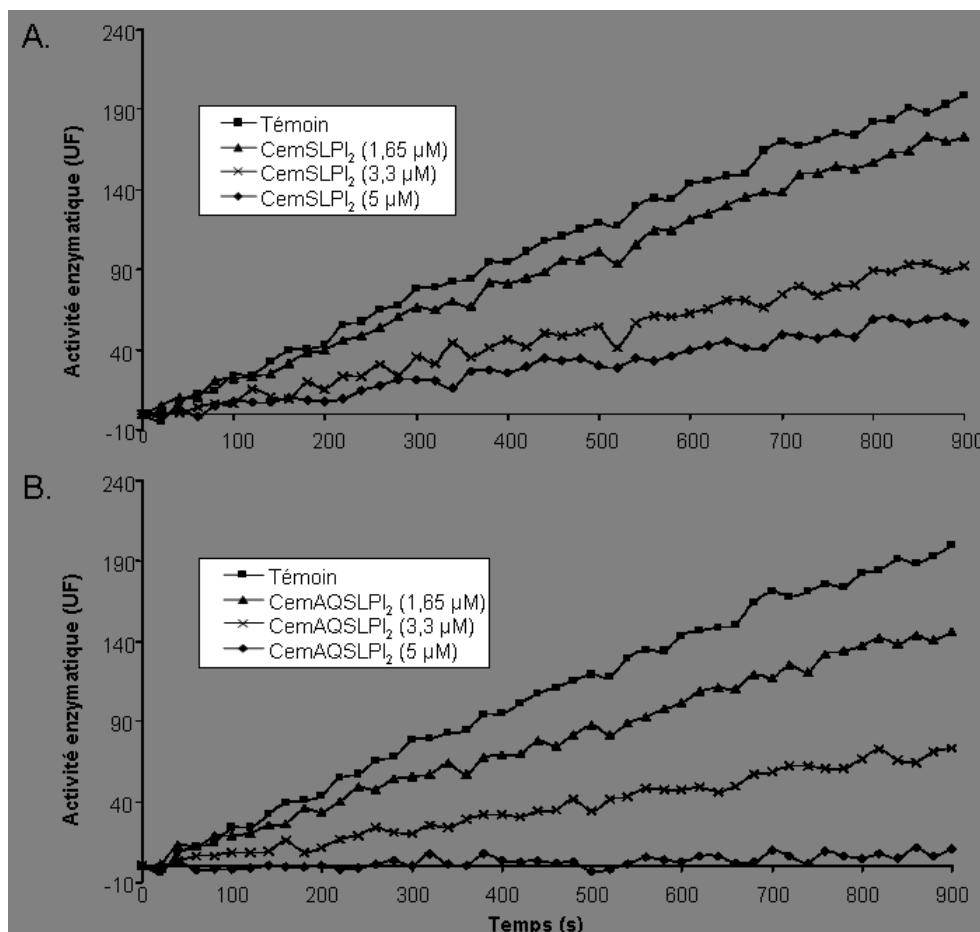


Figure 39 : Inhibition de l'HNE par le CemSLPI₂ (A) et le CemAQSPLI₂ (B) fixés à la fibronectine par la TGase2. L'HNE a été incubée pendant 15 minutes avec les inhibiteurs.

V. Conclusions et perspectives

Dans cette étude, nous avons adopté différentes stratégies afin de développer de nouveaux inhibiteurs polyvalents (inhibition des trois NSPs) capables de se fixer grâce à des transglutaminases tissulaires aux protéines de la matrice extracellulaire.

Les chimères 1 (Elaf-SLPI₂) et 2 (SLPI₂-Elaf) consistent en la fusion du domaine élafine, inhibiteur d'HNE et de Pr3, et du domaine 2 du SLPI, inhibiteur de l'HNE et de la CatG. Ces inhibiteurs chimériques possèdent des valeurs de K_i semblables à celles des inhibiteurs sauvages vis-à-vis des trois NSPs. Ils sont également capables d'inhiber les NSPs liées aux membranes des neutrophiles. Sous l'action de la TGase2, ces chimères sont capables de se fixer à la fibronectine et d'inhiber les trois NSPs. Pour la première fois, nous avons montré que l'élafine et de façon plus importante, la T2, ainsi que les chimères, sont capables de se lier à l'élastine, par transglutamination, et d'inhiber les trois NSPs. Concernant les chimères, le système de production utilisé ne permet pas de produire de grandes quantités

d'inhibiteurs du fait d'une protéolyse non spécifique importante. Ces inhibiteurs ne semblent donc pas être des candidats idéaux pour l'utilisation thérapeutique envisagée qui nécessite de grandes quantités d'inhibiteurs et donc une production à rendement élevé.

L'autre inhibiteur, appelé T2 A62L, est une T2 qui possède en position P1 une leucine comme dans le SLPI. Grâce à cette seule mutation, la T2 A62L est capable d'inhiber la CatG tout en conservant sa capacité inhibitrice vis-à-vis de l'HNE et de la Pr3. Il présente des valeurs de K_i de l'ordre du nanomolaire pour la Pr3 et la CatG et de l'ordre de 10^{-11} M pour l'HNE. Comme pour les chimères, la T2 A62L est capable d'inhiber les trois protéases liées aux membranes des neutrophiles. La T2 A62L est également capable de se lier à la fibronectine sous l'action de la TGase2 mais aussi à l'élastine. Une fois fixé sur ces protéines de la matrice extracellulaire, cet inhibiteur est capable d'inhiber les trois NSPs. Cet inhibiteur est produit et purifié en grande quantité, ce qui fait de cette molécule un candidat idéal pour une étude d'aérosolisation.

En parallèle, une autre stratégie a consisté à concevoir un inhibiteur dérivé du SLPI qui deviendrait capable de se lier par transglutamination aux protéines de la matrice extracellulaire. Nous avons ainsi développé deux inhibiteurs, le CemSLPI₂ et le CemAQLSLPI₂ dans lesquels nous avons greffé le domaine cémentoïne de la T2 au domaine 2 du SLPI. Ces deux inhibiteurs possèdent les mêmes propriétés inhibitrices que le SLPI. Ils inhibent la CatG et l'HNE solubles ou liées aux membranes des neutrophiles et sont également capables de se lier à la fibronectine par transglutamination. Après fixation de ces inhibiteurs, ils restent inhibiteurs de leurs enzymes cibles (HNE, CatG). Dans cette expérience, le CemAQLSLPI₂, qui possède une Gln supplémentaire, potentiellement substrat de transglutaminase, semble mieux se fixer sur la fibronectine. Cet inhibiteur pourrait être utilisé avec de la T2 pour une administration sous forme d'aérosol. Un cocktail de ces deux inhibiteurs permettrait de cibler les trois NSPs dans le cadre d'une thérapeutique anti-inflammatoire.

Nous avons également montré que le SLPI et la T2 A62L étaient capables d'inhiber l'activité « élastase-like » des surnageants de culture d'*A. fumigatus*. Ces résultats nous laissent penser que la T2 A62L, par ses différentes propriétés, constitue une molécule de choix pour une utilisation dans une thérapeutique anti-inflammatoire des maladies pulmonaires.

PUBLICATION N°2

**Zani Marie-Louise, Baranger Kévin, Guyot Nicolas,
Dallet-Choisy Sandrine et Moreau Thierry.**

Protease inhibitors derived from elafin and SLPI and
engineered to have enhanced specificity towards neutrophil
serine proteases

Soumis à publication.

**PROTEASE INHIBITORS DERIVED FROM ELAFIN AND SLPI
AND ENGINEERED TO HAVE ENHANCED SPECIFICITY
TOWARDS NEUTROPHIL SERINE PROTEASES.
NOVEL INHIBITORS POTENTIALLY USEFUL FOR TREATING
INFLAMMATORY LUNG DISEASES**

**Marie-Louise Zani[§], Kévin Baranger[§], Nicolas Guyot[#],
Sandrine Dallet-Choisy[§] and Thierry Moreau[§]**

From [§] Inserm U618 “Protéases et Vectorisation Pulmonaires”, IFR 135 Imagerie
Fonctionnelle, University of Tours, France and [#] Present address: EA Immunité et
Inflammation de l'Epithélium Respiratoire, IFR 53, University of Reims, France

Running title : Engineered protein inhibitors of neutrophil serine proteases

Address correspondence to : Thierry Moreau, Inserm U618 “Protéases et Vectorisation
Pulmonaires”, Faculté de Médecine, 10 Bd Tonnellé 37032 TOURS Cedex France. Fax : 33 2
47 36 60 46; E-mail : moreaut@univ-tours.fr

The secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), elafin, and its biologically active precursor trappin-2 are endogenous (chelonianin family) low-molecular weight inhibitors that target neutrophil serine proteases (NSPs) like elastase, proteinase 3 and cathepsin G. These inhibitors have potential therapeutic values, since unregulated NSP activities are linked to inflammatory lung diseases. We have used two strategies to design polyvalent inhibitors of NSPs. First, we fused the elafin domain (that inhibits elastase and proteinase 3) with the second domain of SLPI (that inhibits elastase and cathepsin G) to produce recombinant chimeras that strongly inhibit all three NSPs with subnanomolar K_i values, similar to those of the parent molecules. Second, we generated another polyvalent tight-binding inhibitor, trappin-2 A62L, a trappin-2 variant in which the P1 residue Ala is replaced by Leu, as in the corresponding position in SLPI domain 2. We have also shown that these molecules are effective against the neutrophil membrane-bound forms of all three NSPs. The trappin-2 A62L and elafin-SLPI chimeras, like wild-type elafin and/or trappin-2, can be covalently cross-linked to fibronectin or elastin by a tissue transglutaminase, while retaining their polypotency towards NSPs. Molecular modeling studies of NSPs complexed with various inhibitors suggest that the selectivity of chelonianins for their target proteases is mainly driven by electrostatic forces. Therefore, the inhibitors described herein could be used in aerosol-based therapies targeting NSPs in inflammatory lung diseases.

The imbalance between protease and anti-protease activity may well be one of the major mechanism involved in inflammatory lung diseases like chronic obstructive pulmonary disease (COPD), emphysema and cystic fibrosis (reviewed in (1-4)). This imbalance is mainly due to a massive recruitment of neutrophils, macrophages and other inflammatory cells at the inflammatory sites. Activated neutrophils release various hydrolytic agents from their granules, including proteases and glycosidases, plus anti-bacterial molecules and enzymes involved in the generation of oxidants (5,6). Among the proteases released from neutrophils, HNE (human neutrophil elastase ; EC 3.4.21.37), Pr3 (proteinase 3 also called myeloblastin ; EC 3.4.21.76) and CatG (cathepsin G ; EC 3.4.21.20) are all capable of hydrolyzing elastin and other important proteins of the extracellular matrix (7) like fibronectin or laminins. They, together with MMP-12 (matrix metalloprotease-12 ; EC 3.4.25.65) secreted by infiltrating

macrophages, may therefore play key roles in the destruction of lung tissues. Neutrophil serine proteases (NSPs) are not only released into the extracellular environment, their active forms are also present at high concentrations at the surface of neutrophils. The catalytic activities and efficiencies of these membrane-bound NSPs are similar to those of their soluble forms (see (8) for a review). Other proteases, such as collagenase MMP-8 or gelatinase MMP-9, both from neutrophils, may be important in inflammatory lung diseases (7).

The activity of NSPs generally extends beyond the proteolytic breakdown of extracellular matrix proteins. They contribute to the perpetuation of inflammation through the proteolytic modification (activation or inactivation) of protease zymogens (e.g pro-MMPs), protease inhibitors, chemokines, cytokines, growth factors and cell surface receptors (7,9-12). Hence, the extracellular forms of key enzymes like the NSPs and macrophage MMP-12 in injured lungs should be inhibited to limit both their degrading and pro-inflammatory actions.

Several endogenous inhibitors help to control the activities of extracellular NSPs in the lungs, but no single inhibitor targets all three proteases (HNE, Pr3, CatG). First, the plasma-derived serpin, α 1-PI (α 1-antitrypsin), preferentially targets HNE in the alveolae, although it can inhibit Pr3 and CatG *in vitro* (13). The other extracellular inhibitors belong to the chelonianin family and comprise secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elafin, together with its active precursor trappin-2 (pre-elafin) (reviewed in (14)). These structurally related molecules have a common fold with a four-disulfide core, the whey acidic protein (WAP) domain which is responsible for protease inhibition. Despite their similarity, they have different inhibitory spectra; elafin and trappin-2 inhibit only HNE, Pr3 and pancreatic elastase, while SLPI inhibits HNE, CatG, chymase, chymotrypsin and trypsin. SLPI is a 107 amino-acid cationic protein containing two WAP domains that is mainly synthesized by the epithelial cells of the upper airways, where it is thought to be the major elastase inhibitor (15). Elafin (57 amino acids) was initially found in lung secretions and is derived from trappin-2 (pre-elafin), an active precursor synthesized by lung epithelial cells, Clara cells and type II pneumocytes (14). Elafin is released from the C-terminus of its precursor trappin-2 (95 residues), perhaps by mast cell tryptase (16). Trappin-2 has a 38-residue N-terminal domain, the cementoin domain, that contains several repeated motifs with the consensus amino acid sequence GQDPVK that is a substrate for tissue transglutaminase. This unique structural feature allows trappin-2 to be cross-linked, by transglutamination, to extracellular matrix proteins like fibronectin, while retaining its inhibitory activity (17). Trappin-2, and to a lesser extent elafin, have emerged in recent years as attractive candidates for anti-inflammatory treatment of pulmonary diseases using anti-protease(s) targeting NSPs. Indeed, trappin-2 significantly reduces inflammation in several animal models, including acute lung injury in hamsters (18) and mice (19), LPS-induced inflammation in mice (20) and porcine pancreatic elastase (PPE)-induced emphysema in mice (21,22). The relatively weaker anti-inflammatory action of elafin in the hamster acute lung injury (ALI) model has been attributed to the fact that trappin-2 can be conjugated to extracellular matrix proteins by tissue transglutaminase(s), while elafin cannot (18). Trappin-2 has other biological functions, in addition to this unique biochemical feature, that are independent of its anti-protease action. It has anti-inflammatory (23-25) and anti-bacterial/anti-fungal properties (26) that considerably reinforce its therapeutic potential.

The delivery of recombinant inhibitors targeting all three serine proteases of the neutrophil using aerosols is likely to correct the disturbed protease-inhibitor balance in lung diseases. Our efforts to produce appropriate anti-proteases led us to design several inhibitors derived from SLPI and/or elafin/trappin-2 that are polyvalent, efficiently inhibiting all three proteases: HNE, Pr3 and CatG. We demonstrate that chimera inhibitors comprising both elafin and SLPI domain 2 inhibitory domains as well as trappin-2 A62L, a trappin-2 variant containing a point mutation in its inhibitory loop mutant, efficiently inhibit both soluble

proteases and proteases bound to the surface membrane of neutrophils. We also evaluated the inhibitory activity of these variants when they were conjugated to fibronectin or elastin by a tissue transglutaminase. The cross-linked inhibitors still inhibited all three NSPs. Our findings provide clues to the structure-function relationships of the chelonianin inhibitors, and these were further explored by molecular modeling of reconstructed protease-inhibitor complexes. Collectively these data suggest that our designed inhibitors may be promising candidates to be used in the aerosol-based treatment of lung diseases.

Experimental procedures

Materials- HNE (EC 3.4.21.37) and PR3 (EC 3.4.21.76) were obtained from Athens Research and Technology (Athens, USA). Cathepsin G (EC 3.4.21.20) was obtained from MP Biomedicals (Vannes, France) and porcine pancreatic elastase (EC 3.4.21.36) was from Elastin Products (Owensville, USA). The concentrations of active enzymes were measured using published methods (27,28). All the enzyme or inhibitor concentrations used for kinetic assays refer to active protein concentrations. Fluorogenic substrates were provided by Prof. Luiz Juliano (University of Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil). Wild type elafin and trappin-2 were produced as tag-free proteins as previously described (29). Wild type SLPI was produced in *Pichia pastoris* by the same procedure, using a cDNA encoding the full-length protein (a gift from Dr. Kemme, University of Darmstadt, Germany). The pPIC9 vector was from Invitrogen (Groningen, The Netherlands) and restriction enzymes were from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Taq/Pwo DNA polymerase (Expand High Fidelity system) was from Roche (Meylan, France). Human fibronectin, bovine neck elastin and guinea pig transglutaminase (EC 2.3.2.13) were obtained from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). All other reagents were of analytical grade.

Oligonucleotides- The following primers (MWG Biotech, Les Ulis, France) were used for PCR amplifications. Restriction sites are underlined.

-Primer L1 SLPI1(Elaf)-SLPI2

5'-TTGAATCCCCCTAACCGCTGCCAGAGTGACTGGCAG-3'. This primer encodes part of the inhibitory loop of trappin-2 (LNPPNR) followed by the C-terminal part of SLPI domain 1 (CQSDWQ)

-Primer L2 SLPI1(Elaf)-SLPI2

5'-CGAGCGGCCGCGGAATCAAGCTTTCACAGG-3', restriction site *NotI*. This primer encodes the C-terminus of SLPI (PVKA) followed by a STOP codon.

-Primer L3 SLPI1(Elaf)-SLPI2

5'-CGACTCGAGAAAAGATCTGGAAAGTCCTTCAAAGCTGGAGTCTGTCCCATTATCTTGATC-3', restriction site *XhoI*. This primer encodes the dibasic doublet KR followed by the N-terminus of SLPI domain 1 (SGKSFKAGVC) then by part of the inhibitory loop of trappin-2 (PIILI)

-Primer L4 SLPI1(Elaf)-SLPI2

5'-GCGGTTAGGGGGATTCAACATGGCGCACCGGATCAAGATAATGGGACAGACTCCAGCTTT-3'. This primer encodes part of SLPI domain 1 (KAGVC) preceding the inhibitory loop of trappin-2 (PIILIRCAMLNPPNR).

-Primer L5 SLPI1(Elaf)-SLPI2

5'-CGACTCGAGAAAAGATCTG-3', restriction site *XhoI*. This primer encodes the dibasic doublet KR followed by the first residue of SLPI (S).

-Primer L6 SLPI1(Elaf)-SLPI2

5'-GCGGTTAGGGGGATTCAAC-3'. This primer encodes the C-terminal part of the inhibitory loop of trappin-2 (LNPPNR).

-Primer C1 Elaf-SLPI2

5'-CGACTCGAGAAAAGAGCGCAAGAGCCAGTCAA-3', restriction site *XhoI*. This primer encodes the dibasic doublet KR used as a cleavage site by the yeast Kex2 protease followed by the N-terminal sequence of elafin (AQEPVK).

-Primer C2 Elaf-SLPI2

5'-CGAGCGGCCCGCGGAATCAAGCTTTCACAGG-3', restriction site *NotI*. This primer encodes the C-terminus part of SLPI (PVKA) followed by a STOP codon.

-Primer C3 Elaf-SLPI2

5'-GCCTGTTTCGTTCCCCAGGACACCCCAAACCCAACA-3'. This junction primer encodes the C-terminus of elafin (ACFVPQ) followed by the N-terminal sequence of SLPI domain 2 (DTPNPT).

-Primer C4 Elaf-SLPI2

5'-TGTTGGGTTTGGGGTGTCTGGGGAACGAAACAGGC-3'. Complementary primer of C3.

-Primer C5 SLPI2-Elaf

5'-CGACTCGAGAAAAGGGATCCTGTTGACACCCC-3', restriction site *XhoI*. This primer encodes the dibasic doublet KR followed by the N-terminal sequence of SLPI2 (DPVDT).

-Primer C6 SLPI2-Elaf

5'-CGAGCGGCCCGCCCCTCTCACTGGGGAAC-3', restriction site *NotI*. This primers encodes the C-terminus of elafin (VPQ) followed by a STOP codon.

-Primer C7 SLPI2-Elaf

5'-TGCGTTTCCCCTGTGAAAGTCAAAGGTCCAGTCTCC-3'. This junction primer encodes the C-terminus of SLPI2 (CVSPVK) followed by the first residues of elafin sequence (VKGPVS).

-Primer C8 SLPI2-Elaf

5'-GGAGACTGGACCTTTGACTTTCACAGGGGAAACGCA-3'. Complementary primer of C7

-Primer T1 Trappin-2 A62L

5'-CGACTCGAGAAAAGAGCTGTCACGGGAGTTCCT-3', restriction site *XhoI*. This primer encodes the dibasic doublet KR followed by the N-terminal sequence of trappin-2 (AVTGVP)

-Primer T2 Trappin-2 A62L

5'-ATCCGGTGCCTCATGTTGAATC-3'. This primer introduces the Ala/Leu mutation (codon CTC, Leu) in the trappin-2 inhibitory loop (IRCLMLNP)

-Primer T3 Trappin-2 A62L

5'-GATTCAACATGAGGCACCGGAT-3'. This primer is complementary to T2

-Primer T4 Trappin-2 A62L

5'-CGAGCGGCCCGCCCCTCTCACTGGGGAAC-3', restriction site *NotI*. This primer corresponds to the C-terminus sequence of trappin-2 (VPQ) followed by a STOP codon.

-Primer T5 Trappin-2 A62L/R69F

5'-TCCCCCTAACTTCTGCTTGAAA-3'. This primer encodes part of trappin-2 sequence (NPPNFCLK) containing the R/F mutation (codon TTC, Phe)

-Primer T6 Trappin-2 A62L/R69F

5'-TTTCAAGCAGAAGTTAGGGGGA-3'. This primer is complementary of T5

-Primer T7 Trappin-2 R60Q/A62L/R69F

5'-ATCTTGATCCAGTGCCTCATG -3'. This primer encodes a part of trappin-2 sequence (ILIQCLM) containing the R/Q mutation (codon CAG, Gln)

-Primer T8 Trappin-2 R60Q/A62L/R69F

5'-CATGAGGCACTGGATCAAGAT-3'. Complementary primer of T7.

Construction of SLPI1(Elaf)-SLPI2, Elaf-SLPI2 and SLPI2-Elaf chimeras and trappin-2 A62L, trappin-2 R60Q/A62L/R69F- All constructs have been cloned in pPIC9 vector using *XhoI* and *NotI* restriction sites so that cDNA inhibitors were fused downstream of the α -peptide sequence i.e immediately downstream the dibasic doublet KR. All PCR reactions were carried out using Taq/Pwo DNA polymerase (Expand High Fidelity system, Roche) at 94°C for 10 sec., 55°C for 30 sec. and 68°C for 40 sec. (30 cycles).

SLPI1(Elaf)-SLPI2

The sequence encoding the last residues of SLPI1 followed by SLPI2 was first amplified by PCR using the pRH 1811 plasmid (containing the coding sequence for SLPI) as template and the forward primer L1 and the reverse primer L2. The SLPI domain 1 with its inhibitory loop (PPKSAQCLRYKKPE) replaced by the corresponding loop of elafin (PIILIRCAMLNPPNR) was then obtained by fusing two oligonucleotides L3 and L4 and amplifying the fusion product by PCR plus L5 as forward primer and L6 as reverse primer. The resulting cDNA corresponding to SLPI domain 1 containing the inhibitory loop of trappin-2 was then fused with that encoding SLPI domain 2 (overlapping sequences), amplified with primers L5 and L2 and cloned into the yeast pPIC9 vector. The nucleotide sequence was then determined.

Elaf-SLPI2 chimera

We amplified the sequence encoding elafin followed by the first residues of the SLPI domain 2 (DTPNPT) using the pGE-SKA-B/K plasmid (containing the sequence encoding trappin-2 between *BamHI* and *KpnI* sites) as template, the forward primer C1, and the junction primer C4. We then amplified the sequence encoding SLPI domain 2 preceded by the last residues of elafin moiety (ACFVPQ) with the same PCR conditions using the pRH 1811 plasmid (containing the sequence encoding SLPI) as template, the forward primer C3 and the reverse primer C2. The two PCR products were fused and the cDNA encoding the full-length of Elaf-SLPI2 was amplified by PCR from the fusion product using C1 as forward primer and C2 as reverse primer.

SLPI2-Elaf chimera

The cDNA was obtained using the approach described above, with the primers C5, C6, C7 and C8 instead of C1, C2, C3, and C4. Both constructs were cloned into pPIC9 vector and sequenced.

Trappin-2 A62L, trappin-2 R60Q/A62L/R69F

We used the pGE-SKA-B/K plasmid containing the trappin-2 sequence as a template to introduce by PCR the A62L mutation into the inhibitory loop with T1 and T2 primers. The PCR product encoding the N-terminal part of trappin-2 including the mutated inhibitory loop was fused with the PCR product corresponding to the C-terminal part of trappin-2 obtained by a similar PCR experiment using primers T3 and T4. The fusion product was amplified using T1 as forward primer and T4 as reverse primer to provide the cDNA encoding trappin-2 A62L. The latter was cloned into the pPIC9 vector which was used as a template to generate by PCR the cDNA encoding trappin-2 A62L/R69F (primers T1, T4, T5 and T6). The third mutation was introduced with primers T7 and T8 before final PCR with primers T1 and T4. Both constructs were sequenced prior to expression.

Expression in Pichia pastoris and purification of inhibitors- About 10 μ g of a recombinant construct that had been linearized with *SalI* was electroporated (ECM399, BTX

electroporator) into *Pichia pastoris* strain GS115 (*his4*) competent cells (Invitrogen). The His⁺ transformants were selected and screened for inhibitor production in small-scale experiments. Large amounts of recombinant mutant inhibitors were purified from positives clones grown in 2 L buffered glycerol-complex medium (BMGY) at 29° C for 2 days. The cells were harvested and suspended in 500 ml buffered methanol-complex medium (BMMY) containing 1% methanol to induce inhibitor production. The supernatant (about 500 ml) was collected from cells grown at 29° C for 1 (trappin-2 R60Q/A62L/R69F), 3 (trappin-2 A62L) or 5 days (chimeras) with a constant methanol concentration (1%) and concentrated 30-fold using a 3 kDa cutoff YM3 ultrafiltration membrane (Millipore, Paris, France). The concentrated supernatants were dialysed over a PD10 column (Amersham Biosciences) against 25 mM sodium phosphate, pH 6.0 (equilibrium buffer) and loaded onto a SourceTM 15S column (1.6 x 15 cm) equilibrated with equilibrium buffer using a Pharmacia AKTA chromatographic system. The column was washed exhaustively with equilibrium buffer to remove unbound proteins and the bound inhibitors were eluted at a flow rate of 1 ml/min with a linear NaCl gradient (0-1 M) in equilibration buffer for 40 min. Absorbance was monitored at 220 nm because these inhibitors contain few aromatic residues. The purity of each inhibitor was assessed by high resolution Tricine SDS-PAGE (30) and N-terminal amino acid sequencing using an Applied Biosystems 477A automated sequencer associated with an on-line model 120A analyzer to identify phenylthiohydantoin derivatives.

Kinetic studies with soluble neutrophil proteases- The equilibrium dissociation constant K_i for the interaction of the protease-recombinant inhibitor pairs was determined by adding substrate to an equilibrium mixture of protease and inhibitor in 50 mM Hepes buffer, pH 7.4, 0.75 M NaCl, 0.05% IGEPAL-CA630 for HNE and Pr3 and in 50 mM Hepes buffer, pH 7.4, 50 mM NaCl for CatG at 37°C. Enzyme activity was measured using specific fluorogenic substrates (10 μ M final) developed in our laboratory: Abz-APEEIMRRQ-EDDnp for HNE, Abz-VADCADQ-EDDnp for Pr3, and Abz-TPFSGQ-EDDnp for CatG (31). The concentration of each substrate was determined by measuring the absorbance at 365 nm, using $\epsilon_{365\text{nm}} = 17,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for EDDnp. The hydrolysis of Abz-peptidyl-EDDnp substrates was measured at $\lambda_{\text{exc}}=320 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{emi}}=420 \text{ nm}$ using a Hitachi F-2000 spectrofluorimeter. Assays with porcine pancreatic elastase were done in 50 mM Hepes buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl using Suc-(Ala)₃-pNA as substrate whose hydrolysis was measured spectrophotometrically at 405 nm. The best estimates of $K_{i(\text{app})}$, the substrate-dependent K_i , were obtained by non-linear regression analysis of the data based on the following equation (1) for tight binding inhibition (32):

$$a = 1 - \frac{([E]_0 + [I]_0 + K_{i(\text{app})}) - \sqrt{([E]_0 + [I]_0 + K_{i(\text{app})})^2 - 4[E]_0[I]_0}}{2[E]_0} \quad (1)$$

where a is the relative steady state rate, $[E]_0$ is enzyme concentration and $[I]_0$ the inhibitor concentration. Assuming that S and I compete for binding to E, the following relationship was used to calculate the true K_i : $K_i = K_{i(\text{app})} / (1 + [S]_0/K_m)$, where K_m is the Michaelis constant for a given enzyme-substrate pair and $[S]_0$ is the initial substrate concentration. K_i values for inhibitors that did not display tight binding inhibition were estimated using the appropriate equation for competitive inhibition:

$$v_i = v_0 / (1 + [I]_0 / K_{i(\text{app})}) \quad (2)$$

where v_i is the measured reaction velocity with inhibitor and v_0 without inhibitor.

Rate constants for the association (k_{ass}) between inhibitors and proteases were determined by monitoring the time dependence of association of equimolar amounts of enzyme and inhibitor at 37 °C. The concentrations used to measure the residual enzyme activity at different times after adding appropriate substrate (10 μM) were in the 0.1 nM range. Experimental data were plotted according to equation (3) for second-order kinetics (33), assuming there was no dissociation of the complex during the experiment :

$$1/[E] = k_{\text{ass}} t + 1/[E]_0 \quad (3)$$

with $[E]_0$ being the initial enzyme concentration and $[E]$ the enzyme concentration at time t .

Inhibition assays of membrane-bound neutrophil proteases- Human neutrophils (PMNs) were purified from 4 ml samples of peripheral blood collected from healthy volunteers into EDTA-containing tubes essentially as previously reported (34). The purified PMNs were kept at room temperature with gentle shaking and washed with PBS just before use. Cell viability was checked by trypan blue exclusion.

PMNs were activated by suspending $3 \cdot 10^6$ cells/ml in PBS containing 1 mM CaCl_2 and 1 mM MgCl_2 and incubating them with the calcium ionophore A23187 (1 μM final) for 15 min at 37°C. Then they were centrifuged at 2000 g for 5 min at 20°C. The PMN pellet was suspended in PBS and kept at room temperature under gentle shaking until enzymatic tests.

Purified PMNs were preincubated in 160 μL 50 mM Hepes buffer 150 mM NaCl, pH 7.4 with inhibitor (1nM to 100 nM depending on the inhibitor) for 30 min in each microplate well at 37 °C. The residual enzyme activity was measured using 10 μM of Abz-APEEIMRRQ-EDDnp for HNE, Abz-VADnVADYQ-NitroTyr (nV=norvaline) for Pr3 or Abz-TPFSGQ-EDDnp for CatG. The number of cells was adjusted so that the protease concentration was in the nanomolar range, as assessed from estimations using k_{cat}/K_m values for substrate hydrolysis by each neutrophil protease (31, 34, 35). The increase in fluorescence following substrate hydrolysis was recorded at $\lambda_{\text{exc}}=320$ nm and $\lambda_{\text{emi}}=420$ nm using a SPECTRAmax Gemini microplate fluorescence reader (Molecular Devices) that allows continuous stirring during the reaction.

Inhibitory properties of recombinant inhibitors cross-linked to fibronectin by transglutaminase- ELISA microplates (96-well, Fluoronunc Maxisorp plates) were coated (2 $\mu\text{g}/\text{well}$) with fibronectin or elastin in 0.1 M sodium carbonate buffer (pH 9.5) by incubation overnight at 4°C. The coated plates were washed with 25 mM potassium phosphate buffer pH 7.4, 0.15 M NaCl and free sites blocked by incubation in 50 mM Tris, 150 mM NaCl, 2% Tween 20 for 1 h at 37 °C. WT inhibitors (10^{-6} M elafin, trappin-2, SLPI) or mutant inhibitors (10^{-6} M Elaf-SLPI2, SLPI2-Elaf or trappin-2 A62L) were incubated in wells with guinea pig liver transglutaminase ($1.25 \cdot 10^{-7}$ M) in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5, 2 mM CaCl_2 , 0.1 mM DTT for 2 h at 37 °C to allow the formation of cross-linked complexes with fibronectin or elastin. The plates were again extensively washed with the same buffer as above and human elastase (10^{-9} M), proteinase 3 ($2 \cdot 10^{-9}$ M) or cathepsin G ($2 \cdot 10^{-9}$ M) in an appropriate activity buffer was added and incubated for 15 min at 37°C to allow the formation of protease-inhibitor complexes. Residual protease activity was then measured with 10 μM of appropriate fluorogenic substrate and a SPECTRAmax Gemini microplate reader.

Electrostatic potential analysis- The three-dimensional distributions of electrostatic potentials around each component of the protease-inhibitor complexes were calculated using the finite difference Poisson Boltzmann (FDPB) method (36) as implemented in DELPHI software (INSIGHT II suite, Accelrys Inc). The ionic strength was set to 0.15 M and the dielectric

constant to 4 for the protein interior and 80 for the solvent. Calculations were performed at pH 8.0 at a temperature of 300K. Formal charges, rather than all charges, were assigned as follows: arginine, lysine, N-terminus, +1; glutamate, aspartate, C-terminus, -1; and histidine, neutral. Contours of electrostatic potentials were displayed at $\pm 5 \text{ kTe}^{-1}$ using INSIGHT II.

RESULTS

Combination of elafin and SLPI inhibitory domains to generate chimeras that are polyvalent NSP inhibitors- Elafin (57 amino acids) and its precursor trappin-2 (95 amino acids, also known as pre-elafin) have the same characteristic four-disulphide core-containing inhibitory domain that is similar to the whey acidic protein (WAP domain). These two inhibitors have a quite narrow spectrum of activity since they inhibit only elastases of neutrophil and pancreatic origin and neutrophil Pr3. We have previously demonstrated that both molecules have virtually identical inhibitory potency towards their target enzymes (29), implying that the N-terminally-located cementin domain of trappin-2 does not interfere with complex formation. SLPI (107 amino acids) is composed of two domains, each structurally similar to elafin (about 40% sequence identity). SLPI has a wider inhibitory spectrum than elafin/trappin-2: HNE, CatG, chymase, chymotrypsin and trypsin are strongly inhibited, although only domain 2 (C-terminal) appears to be involved in binding to neutrophil proteases. Both inhibitors, SLPI and elafin/trappin-2 are naturally present in human lungs. SLPI is believed to be mainly in the upper airways (37), while trappin-2 and elafin, from which it is derived, are mainly produced by cells of the lower respiratory tract (38). This, together with the fact that each inhibits only two of the three major neutrophil neutral serine proteases (NSPs), suggests that inhibiting all three NSPs at the same time with a polyvalent inhibitor would help to limit their deleterious effects. We have used various strategies to design such a polyvalent inhibitor of NSPs that combines the inhibitory properties of both SLPI and elafin.

Assuming that SLPI2 (domain 2 of SLPI) binds HNE or CatG, while SLPI1 (domain 1 of SLPI) does not (39,40), we have grafted the inhibitory loop of elafin which interacts with HNE and PR3 into the corresponding loop of SLPI1 of the whole SLPI molecule. However, there is a one-residue deletion between Cys54I and Cys61I on the non-prime side of the elafin reactive site loop (RSL) and a one-residue insertion between Cys61I and Cys70I on the prime side of elafin RSL compared to the SLPI1 loop (Fig. 1). We therefore replaced the entire region between Cys10I and Cys26I of SLPI1 with the corresponding Cys54I-Cys70I region of elafin (Fig.1) in the SLPI-derived mutant inhibitor denoted SLPI1(Elaf)-SLPI2 (Fig. 2) to avoid a shift in the spatial position of the P2 Cys that plays a critical role in the RSL conformation. Unfortunately, we could not test its properties because we did not succeed to produce this inhibitor in sufficient amounts in our *Pichia pastoris* expression system under different experimental conditions due to proteolytic degradation of the molecule.

The second strategy was to produce double-headed chimeric inhibitors combining the elafin domain and the SLPI2 domain. Since the SLPI molecule is made up of two homologous WAP domains, each structurally similar to the elafin domain (Fig. 2A-2B), we have replaced the non-inhibitory SLPI1 domain by elafin to give Elaf-SLPI2 (Fig. 2C). In the second chimera, SLPI2-Elaf, the elafin domain was introduced on the C-terminal side of SLPI2 (Fig. 2C). We could predict that both chimeras will adopt the polypeptide folding motif of SLPI because there are surprisingly few intermolecular contacts between the two domains of native SLPI (41). In addition, molecular modeling studies indicate that each polyvalent chimera should bind two protease molecules simultaneously, assuming that each inhibitory domain binds its cognate protease without inducing large conformational changes (data not shown). Both mutants interacted strongly with all three NSPs, indicating that the overall structure was

intact, with K_i values in the 10^{-11} M range for NSPs. (Table 1). Both chimeras inhibited HNE with essentially the K_i values as the parent inhibitors, while Elaf-SLPI2 appeared to be a slightly better inhibitor of Pr3 ($K_i \approx 1.5$ -fold $<$) than SLPI2-Elaf ($K_i \approx 3.5$ -fold $>$) or elafin (Table 1). CatG had a greater affinity for both mutant inhibitors ($K_i \approx 5$ -fold lower for Elaf-SLPI2 and 7-fold lower for SLPI2-Elaf) than native SLPI under the same conditions (Table 1). Titration experiments using active site-titrated NSPs and chimeras also confirmed that the stoichiometry of inhibition (E:I ratio) was 2:1 for HNE and 1:1 for Pr3 and CatG. Thus each domain in both chimeras was fully functional. The two chimeras bound to NSPs very rapidly, as assessed by the fact that the rate constants for association k_{ass} were much greater than $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Table 1) indicating that they are fast-acting, pseudo-irreversible inhibitors. Porcine pancreatic elastase (PPE), which has a 3D structure very similar to HNE (r.m.s deviation = 0.93 Å over 194 Cα atoms), has a significantly lower affinity (≈ 250 -fold) for both chimeras than the NSPs, with nanomolar K_i values.

Although we successfully purified sufficient recombinant chimeras to study their inhibitory properties, the protein concentration appeared to be rather low and probably not compatible with the large scale production needed for aerosolisation studies with either inhibitor.

The A62L trappin-2 mutant gains cathepsin G inhibition- We wanted to design trappin-2 mutants with a minimum number of mutations in the inhibitory loop that would bind to CatG and retain its tight-binding inhibition of HNE and Pr3 because our *Pichia pastoris* expression system produced large amounts of WT trappin-2 with almost no unwanted proteolysis (29). We considered that producing recombinant inhibitors at high levels is essential for the development of inhibitors intended to be used clinically. We designed a trappin-2 variant, trappin-2 A62L, based on the sequences of the inhibitory loops of SLPI and elafin/trappin-2 (Fig.1), in which the P1 Ala of trappin-2 was replaced by a Leu residue, the corresponding residue in SLPI domain 2, which is responsible for inhibiting CatG.

We used molecular modeling to identify the structural features -in addition to the P1 residue of the RSL- that render CatG resistant to elafin/trappin-2 inhibition. We constructed the putative elafin-CatG by superimposing CatG (PDB code: 1CGH) on the homologous PPE of the elafin-PPE complex (PDB code: 1FLE). We then attempted to identify the structural basis for the lack of inhibition of CatG by elafin. After energy minimization to relieve steric local clashes at the interface of the reconstructed complex, we calculated the electrostatic potentials for the separated molecules of the complex with DELPHI. The contours of the electrostatic potentials (Fig. 6) displayed for each molecule of the complex revealed that two positively charged residues, Arg 60I and Arg 69I (trappin-2 sequence numbering), replaced by neutral residues in SLPI2, are involved in unfavourable positive-positive overlaps that may explain the absence of inhibition of CatG by elafin/trappin-2. We checked this hypothesis by designing a trappin-2 variant, trappin-2 R60Q/A62L/R69F, in which Arg60 (P3 residue) was replaced by Gln and Arg69 (P7' residue) by Phe (as in the SLPI2 inhibitory loop), in addition to the A62L substitution at position P1 (Fig.1). This triple trappin-2 mutant thus had the same loop sequence as the P3-P7' region of SLPI. Surprisingly, a single point mutation at position P1 was sufficient for trappin-2 A62L to gain CatG inhibition. It was a fairly good inhibitor of CatG with a nanomolar K_i but a 20-fold greater K_i for Pr3 than WT trappin-2 and a slightly improved (2-fold) affinity for HNE (Table 1). According to our hypothesis, the triple mutant, trappin-2 R60Q/A62L/R69F behaves as a moderately better inhibitor of CatG than the A62L variant, with a 2-fold greater affinity. Although the three mutations in the inhibitory loop of this variant significantly gave it a better inhibition of HNE (5-fold greater affinity) than WT trappin-2, their effect on Pr3 inhibition was substantially detrimental – it did not inhibit Pr3 (Table 1). Also, compared with WT trappin-2, we can notice that differences in affinity for

both trappin-2 variants originate from increase or decrease in rate constants for association, the best affinities being associated with the highest k_{ass} (Table 1). This suggests that selectivity of chelonianin inhibitors for NSPs is mainly due to the nature of few residues in the inhibitory loop that give it the conformation required for it to fit into the protease active site. We have previously observed that substitution of the Met P1' in elafin dramatically altered Pr3 inhibition ((42) and unpublished data). This study suggests that the P3 Arg of elafin/trappin-2 is critical for Pr3 inhibition, in addition to position P1', since neither trappin-2 R60Q/A62L/R69F nor SLPI inhibited Pr3. The P7' Arg69 of trappin-2 seems to be less critical for Pr3 inhibition than for CatG inhibition because it does not overlap sterically or electrostatically with Pr3 (not shown), while it does interfere with CatG inhibition (see below and Fig.6).

In addition, we can notice that the affinity of both trappin-2 variants for pancreatic elastase is about one order of magnitude lower than that of WT trappin-2. The "SLPI-like" nature of their inhibitory loops render them poor inhibitors of PPE ($K_i \geq 2 \times 10^{-8}$ M), like WT SLPI which interacts loosely with PPE (Table 1).

Inhibition of membrane-bound proteases by polyvalent inhibitors- We compared the capacities of our various chelonianin inhibitors to inhibit membrane-bound and soluble NSPs. The binding of proteases to the neutrophil membrane preserves their catalytic activity against protein substrates in the immediate vicinity of activated neutrophils (see (7) for review). It has been suggested that membrane-bound proteases are resistant to natural inhibitors, especially the high molecular mass serpins like $\alpha 1$ -PI and $\alpha 1$ -antichymotrypsin (7,43), although this is rather controversial since other data indicate that HNE at the neutrophil surface is fully controlled by $\alpha 1$ -PI (44). All the inhibitors tested, both WT chelonianins and mutant inhibitors, inhibited their respective target protease(s) bound at the cell surface in a time- (not shown) and dose-dependent manner (Fig. 3). The concave shape of the inhibition curves is indicative of a fast, tight-binding, and reversible inhibitory process (32). Elafin/ trappin-2 did not inhibit membrane-bound CatG but did inhibit HNE and Pr3 and SLPI did not inhibit bound Pr3 but did inhibit CatG at the neutrophil surface (Fig.3 and Fig. 4). The polyvalent inhibitors inhibited all three of the membrane-bound neutrophil proteases, but not with the same efficiency. The residual activity of each protease incubated with 100 nM inhibitor differed (Fig. 4), reflecting different affinities (different K_i s), in agreement with the results obtained with soluble proteases (Table 1). HNE, which had the lowest K_i of the soluble proteases, appeared to be the most sensitive to inhibition by chimeras or trappin-2 A62L. Similarly, Pr3 which tended to have a lower affinity for the engineered inhibitors, has a higher residual activity in the presence of inhibitors than did HNE or CatG (Fig. 4). Correlatively, we can assume that in our experimental conditions where all three proteases are present at the cell surface in unknown proportions, the partitioning of the polyvalent inhibitors on each protease is dependent on both the concentration of membrane-bound protease and the respective affinity of inhibitors. These data clearly indicate that HNE, Pr3 and CatG bound to neutrophil membranes can be inhibited by both their physiological inhibitors and our engineered polyvalent inhibitors developed in this study.

Activities of polyvalent inhibitors cross-linked to fibronectin or elastin by transglutamination- We have previously shown that elafin and trappin-2 covalently bound to fibronectin by the catalytic action of a tissue transglutaminase (TGase) are still active protease inhibitors, although the rate at which they associate with their target proteases is somewhat decreased (17) as a consequence of inhibitor immobilization. We now tested the capacities of our polyvalent inhibitors (chimeras and trappin-2 A62L) linked to fibronectin or elastin by TGase to inhibit all three NSPs. Trappin-2 A62L linked to fibronectin or elastin efficiently inhibited

HNE and Pr3. Immobilized T2 A62L also inhibited CatG, in line with the data for soluble inhibitors (Fig.5). Somewhat surprisingly, Elaf-SLPI2 (Fig.5) and SLPI2-Elaf cross-linked to fibronectin or elastin also inhibited all three NSPs (data not shown). This suggests that the sequence motif AQEPVK of the elafin moiety thought to be involved in transglutamination (45) is still accessible to the TGase active site in both chimeras. But the activities of inhibitors cross-linked to elastin were lower than those of inhibitors cross-linked to fibronectin despite the coupling conditions being the same for each inhibitor. This indicates that either fibronectin is a better TGase substrate than elastin, or that inhibitors cross-linked to elastin are less efficient than they are when bound to fibronectin. Importantly we show here for the first time that elastin-bound inhibitors still retain inhibitory activity.

Electrostatic interactions and the selectivity of chelonianin inhibitors for NSPs - We analyzed the interfaces of reconstructed protease-inhibitor complexes by molecular modeling to elucidate the structural basis for the NSP inhibition profiles of natural and mutant inhibitors. We also performed electrostatic calculations on various protease-inhibitor complexes because electrostatic interactions are crucial for the stability of protein-protein complexes and the specificity of binding (46-48). However, electrostatic interactions may be favorable or unfavorable, and many studies have shown that electrostatic complementarity is a general feature of protein-protein interfaces (49,50), including protease-inhibitor complexes (51,52).

Theoretical complexes were built using elafin extracted from the elafin-PPE complex (PDB code: 1FLE) or SLPI extracted from the SLPI-chymotrypsin complex and an appropriate protease (CatG, Pr3 or PPE). These were then superimposed on the inhibitor or protease component of the elafin-PPE or SLPI-chymotrypsin complex. Steric clashes at the protease-inhibitor interface were relieved by minimization and the electrostatic potentials of each partner of the complex in aqueous solution were calculated using DELPHI. As mentioned above, the lack of CatG inhibition by elafin appears to involve Arg60I and Arg69I (trappin-2 numbering) in elafin, two positively charged residues that overlap with the positive field surrounding the entire CatG molecule (Fig.6A, B). No other structural feature was found to be critical at the complex interface. Surprisingly, SLPI, which has a much more positive charge (net charge:+12) than elafin (net charge:+3), did interact strongly with CatG despite this protease being highly cationic (net charge:+23). The contours of electrostatic potentials revealed how these two highly positively charged proteins can interact (Fig. 6C): the shape of electrostatic field around SLPI was such that there were no unfavorable overlaps with the CatG isopotential positive surface.

Unlike CatG, Pr3, which is almost neutral (net charge :+1) is not inhibited by SLPI. This could be due to unfavorable positive-positive contacts at two locations, one involving Arg36E/Arg65E (chymotrypsinogen numbering) and the other Arg168E/Lys99E (Fig. 6D). These basic residues in Pr3 that prevent SLPI binding are replaced by neutral residues in CatG (Arg36E/Gln, Lys99E/Ile, Arg168E/Leu) or have no equivalent since they are located in surface loops that are structurally different in the two enzymes. Elafin established at least two complementary (favorable) electrostatic contacts with PPE in the PPE-elafin complex, one involving Glu84I with Arg217E (Fig. 6E) of the enzyme and the other involving Arg69I with a negative region of PPE contributed by Asp60E, Asp97E and Asp98E (Fig. 6F). However these contacts are lost in the putative SLPI-PPE complex (Arg69I and Glu84I replaced by Phe and Met in SLPI) while at the same time unfavourable positive-positive overlaps appear between the two molecules (data not shown). Recent data (53) suggest that the selectivity of SLPI2 for HNE rather than PPE is due to the P5 Tyr68I residue in SLPI, which interferes with the Ser169E-Val176E region of PPE. Our analysis revealed that SLPI Tyr68I in the conformation found in SLPI-chymotrypsin complex (41), which is quite different from that in the SLPI2-HNE complex (53) (PDB code: 2Z7F), did not interfere with this region of PPE in

the reconstructed complex, but rather interacted with it through Van der Waals forces (not shown). We also found that the P1 pocket of PPE was much smaller ($88 \text{ \AA}^3$) than that of HNE ($153 \text{ \AA}^3$) or CatG ($248 \text{ \AA}^3$) as calculated by CastP (54), so that it would be more difficult for PPE to accommodate a Leu P1 residue (SLPI) than a shorter residue like Ala as found in elafin/trappin-2. Indeed, the affinity of PPE for trappin-2 A62L was significantly lower (about 60-fold) than its affinity for WT trappin-2.

These results suggest that both electrostatic constraints and a few critical interactions - particularly those involving the inhibitor P1 and P3 residues - play a crucial role in chelonianin selectivity.

DISCUSSION

Published data provide compelling evidence that serine and metalloproteases are major factors in chronic, neutrophilic lung diseases such as chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and cystic fibrosis. These proteases not only destroy many structural proteins like elastin, they also exhibit pro-inflammatory activities that help perpetuate inflammation. This suggests that inhibiting one or more proteases with protease inhibitors, delivered as recombinant therapeutics or by gene therapy, could limit the pro-inflammatory and destructive effects of proteases. NSPs have long been recognized as potential targets, but efforts have focused on neutrophil elastase rather than Pr3 and CatG, which are also released from the cells and have similar biological effects, despite some functional differences. However, the uncontrolled proteolysis in inflamed lungs is not due solely to the overwhelming of endogenous protease inhibitors by the release of massive amounts of proteases from neutrophils. It has been suggested that NSPs preserve their catalytic activity through different mechanisms (7), including tight binding to their substrates (e.g elastin), resistance of membrane-bound enzymes to their endogenous inhibitors, or adherence of neutrophils to the extracellular matrix with the formation of a microenvironment that preserves proteolytic activity.

We have prepared and characterized mutant inhibitors derived from natural lung inhibitors as part of our ongoing efforts to design recombinant inhibitors that efficiently inhibit all three NSPs, HNE, Pr3 and CatG and could be used in an aerosol-based treatment of lung diseases. We have examined SLPI, trappin-2 and inhibitory domains from both molecules in chimera constructs. We first designed chimeric inhibitors containing elafin and domain 2 of SLPI in a single polypeptide chain, as SLPI inhibits HNE and CatG but not Pr3, while trappin-2 and elafin inhibit HNE and Pr3 with the same efficiency, but not CatG. Analysis of the three-dimensional structure of SLPI revealed that the two WAP domains, which are structurally homologous to elafin, were arranged in such a way that there were few non-covalent contacts between them (41). Thus the trypsin-inhibiting domain 1 of SLPI might be replaced by elafin to give a double-headed inhibitor. The inhibitory activities of two chimeras were evaluated, one with an N-terminal elafin followed by SLPI2 (Elaf-SLPI2), and the other with an N-terminal SLPI2 followed by elafin (SLPI2-Elaf). Both chimeras were active and almost equipotent against all three NSPs, with even lower K_i and higher k_{ass} values than the parent SLPI and elafin molecules. Although they are fast-acting inhibitors that could be of therapeutic interest, they were difficult to produce in our *Pichia pastoris* system because of low yields and non-specific proteolysis. The other strategy for producing a polyvalent inhibitor was based on the observation that mutating the P1 residue of the inhibitory loop of a canonical inhibitor may dramatically change its inhibitory spectrum (55-57). We therefore replace the P1 Ala of trappin-2 with Leu, the corresponding P1 residue in SLPI2, a domain that strongly inhibits CatG. The resulting trappin-2 A62L inhibited CatG and, most

importantly, still inhibited HNE and Pr3, despite a moderately increased K_i for its interaction with Pr3 (about 20-fold greater than trappin-2). CatG interacted with trappin-2 A62L less strongly than with SLPI (about <30-fold), but the K_i was still in the nanomolar range. Our kinetic data indicate that our engineered inhibitors, and especially trappin-2 A62L, which is readily synthesized in our expression system, have the kinetic characteristics that make them potential therapeutic inhibitors. They should be fast acting inhibitors of all three NSPs (times for total inhibition of a few milliseconds ($d(t)=5/k_{\text{ass}} [I]_0$ (33)), and be pseudo-irreversible inhibitors ($[I]_0/K_i$ ratio > 103 (32)), provided they are delivered in large enough quantities. We also find that trappin-2 A62L is a poor inhibitor of PPE. As human pancreatic elastase and PPE are structurally similar (90 % sequence identity), human pancreatic elastase will probably also interact loosely with trappin-2 A62L, although we did not test trappin-2 A62L against it. This means that an aerosol-delivered trappin-2 A62L would have little or no impact on pancreatic elastase, even if the inhibitor entered the gastrointestinal tract. It is important to restrict inhibition to airway proteases in cystic fibrosis, so as not to aggravate any pancreatic deficiency.

It was difficult to identify the structural determinants of natural and mutant chelonianins that direct their target specificity using inhibition data. We therefore examined the 3D structures of several chelonianin-NSP complexes that had been elucidated by X-ray crystallography or were reconstructed from available enzyme and inhibitor X-ray coordinates. Analysis of the protease-inhibitor interface confirmed the importance of the inhibitor P1 residue for specificity, as previously established for canonical inhibitors. This is strikingly illustrated in the trappin-2 A62L variant that inhibited CatG due to a single amino acid substitution at P1. Inhibition data indicate that P3 Arg in trappin-2, and to a lesser extent P7' Arg, are critical for inhibiting proteases, since trappin-2 R60Q/A62L/R69F does not interact with Pr3. The conformations of the structurally equivalent SLPI P3 residue Gln70 in the SLPI-chymotrypsin and SLPI-HNE complexes is such that its side chain points in totally opposite directions in them (not shown). We can then speculate that the P3 Gln in the triple mutant has not the proper conformation to fit into the Pr3 active site. We found no other conspicuous stereochemical constraints at the protease-inhibitor interface of the examined complexes, even in complexes that did not form (e.g SLPI-Pr3). However, *in silico* calculations indicated that favorable electrostatic interactions are correlated with high affinity for a given complex, while unfavorable repulsive electrostatic forces are associated with poor inhibition of a given protease. Hence, electrostatics may well play a key role in inhibition specificity, along with other, as yet unidentified, structural determinants. This can be correlated with our previous findings that the substrate specificity of HNE and Pr3 depends on the charge distribution around the enzyme active site (35).

Our engineered molecules not only inhibit soluble proteases, they also inhibit membrane-bound proteases on activated neutrophils. Wild type inhibitors (SLPI, elafin/trappin-2) also inhibit their target proteases when they are bound at the surface of neutrophils. This is in contrast to previous studies using fixed PMNs to which exogenous protease(s) were added. They found that membrane-bound proteases were resistant to their physiologic inhibitors (43,58). Inhibition was not total under our experimental conditions, but the proteolytic activity of cell-bound NSPs was significantly reduced (by 70-90%) with 20- to 100-fold molar excess of inhibitor. Inhibition may not have been total because the polyvalent inhibitors are distributed amongst the three proteases, as all three are present at the cell surface under our experimental conditions. Also, since inhibition is reversible, the shape of the inhibition curve may be concave rather than linear because of a low $[E]_0/K_i$ ratio. Thus 100% inhibition is possible, but at a much higher inhibitor-enzyme ratio than 1:1 (32,33). Nevertheless, our results demonstrate that natural and engineered chelonianins can efficiently

protect substrates from destruction by membrane-bound NSPs, as shown earlier for SLPI (59) or recently for α 1-PI (44).

The capacity of our inhibitors to be cross-linked to extracellular matrix proteins by a TGase enhances their therapeutic potential. They retain their capacity to inhibit NSPs under these conditions, as do WT trappin-2 and elafin (17), suggesting that they may locally protect substrates from proteolysis by NSPs. Although trappin-2 and/or elafin have been shown to be associated with lung tissues (60,61) or elastin (62) most probably by TGase-catalyzed cross-linking, the precise biological significance of this TGase-catalyzed conjugation remains to be elucidated. Perhaps inhibitors cross-linked to substrates by tissue TGase may be located on the surface of insoluble structures (e.g elastin), where they may efficiently inhibit protease activities. The immobilization of these inhibitors on structural proteins would increase their bioavailability. The fact that there is increased TGase activity in several inflammatory diseases (63), including cystic fibrosis (64), suggests that aerosolized recombinant inhibitors could indeed be cross-linked by TGase *in vivo*. Which glutamine or lysine residues are the target(s) of TGase cross-linking is not yet known, but they are probably in the GQDPVK consensus motif, or perhaps involve the C-terminal glutamine of elafin (65), both of which are present in the inhibitors studied here. We are now working to identify the transglutamination site(s) in these chelonianin inhibitors.

Our mutants probably also have all or some of the other biological functions of chelonianins (reviewed in (14)), in addition to being inhibitors, including intrinsic anti-inflammatory and anti-bacterial properties. They thus have many of the properties essential for use in aerosol-based treatments of inflammatory lung diseases.

Acknowledgments

We thank Dr. Wolfram Bode (Munich) for providing the atomic coordinates of the chymotrypsin-SLPI complex, Jérôme Jaillet and Alexandre Gauthier for help in neutrophil purification, Dr. Michèle Brillard for N-terminal sequencing and Prof. Luiz Juliano for providing the fluorogenic substrates. The English text was edited by Owen Parkes. KB holds a joint doctoral fellowship from Inserm and the Région Centre (France). This work was supported by the French National Research Agency (project ANR-07-PHYSIO-029-01).

REFERENCES

1. Owen, C. A. (2008) *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* **3**, 253-268
2. Shapiro, S. D. (2002) *Biochem Soc Trans* **30**, 98-102
3. Shapiro, S. D. (2003) *Eur Respir J Suppl* **44**, 30s-32s
4. Voynow, J. A., Fischer, B. M., and Zheng, S. (2008) *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 1238-1245
5. Faurschou, M., and Borregaard, N. (2003) *Microbes Infect* **5**, 1317-1327
6. Ganz, T., Selsted, M. E., Szklarek, D., Harwig, S. S., Daher, K., Bainton, D. F., and Lehrer, R. I. (1985) *J Clin Invest* **76**, 1427-1435
7. Owen, C. A., and Campbell, E. J. (1999) *J Leukoc Biol* **65**, 137-150
8. Owen, C. A. (2008) *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 1246-1272
9. Nathan, C. (2006) *Nat Rev Immunol* **6**, 173-182
10. Pham, C. T. (2008) *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 1317-1333
11. Wiedow, O., and Meyer-Hoffert, U. (2005) *J Intern Med* **257**, 319-328
12. Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., and Halbwachs-Mecarelli, L. (2000) *Lab Invest* **80**, 617-653
13. Korkmaz, B., Poutrain, P., Hazouard, E., de Monte, M., Attucci, S., and Gauthier, F. L. (2005) *Am J Respir Cell Mol Biol* **32**, 553-559
14. Moreau, T., Baranger, K., Dade, S., Dallet-Choisy, S., Guyot, N., and Zani, M. L. (2008) *Biochimie* **90**, 284-295
15. Vogelmeier, C., Hubbard, R. C., Fells, G. A., Schnebli, H. P., Thompson, R. C., Fritz, H., and Crystal, R. G. (1991) *J Clin Invest* **87**, 482-488
16. Guyot, N., Zani, M. L., Berger, P., Dallet-Choisy, S., and Moreau, T. (2005) *Biol Chem* **386**, 391-399
17. Guyot, N., Zani, M. L., Maurel, M. C., Dallet-Choisy, S., and Moreau, T. (2005) *Biochemistry* **44**, 15610-15618
18. Tremblay, G. M., Vachon, E., Larouche, C., and Bourbonnais, Y. (2002) *Chest* **121**, 582-588
19. Simpson, A. J., Wallace, W. A., Marsden, M. E., Govan, J. R., Porteous, D. J., Haslett, C., and Sallenave, J. M. (2001) *J Immunol* **167**, 1778-1786
20. Vachon, E., Bourbonnais, Y., Bingle, C. D., Rowe, S. J., Janelle, M. F., and Tremblay, G. M. (2002) *Biol. Chem.* **383**, 1249-1256
21. Doucet, A., Bouchard, D., Janelle, M. F., Bellemare, A., Gagne, S., Tremblay, G. M., and Bourbonnais, Y. (2007) *Biochem J* **405**, 455-463
22. Janelle, M. F., Doucet, A., Bouchard, D., Bourbonnais, Y., and Tremblay, G. M. (2006) *Biol Chem* **387**, 903-909
23. Butler, M. W., Robertson, I., Greene, C. M., O'Neill, S. J., Taggart, C. C., and McElvaney, N. G. (2006) *J Biol Chem* **281**, 34730-34735
24. Henriksen, P. A., Hitt, M., Xing, Z., Wang, J., Haslett, C., Riemersma, R. A., Webb, D. J., Kotelevtsev, Y. V., and Sallenave, J. M. (2004) *J Immunol* **172**, 4535-4544
25. Sallenave, J. M., Cunningham, G. A., James, R. M., McLachlan, G., and Haslett, C. (2003) *Infect Immun* **71**, 3766-3774
26. Baranger, K., Zani, M. L., Chandenier, J., Dallet-Choisy, S., and Moreau, T. (2008) *FEBS J* **275**, 2008-2020
27. Boudier, C., and Bieth, J. G. (1992) *J Biol Chem* **267**, 4370-4375
28. Rao, N. V., Wehner, N. G., Marshall, B. C., Sturrock, A. B., Huecksteadt, T. P., Rao, G. V., Gray, B. H., and Hoidal, J. R. (1991) *Ann N Y Acad Sci* **624**, 60-68
29. Zani, M. L., Nobar, S. M., Lacour, S. A., Lemoine, S., Boudier, C., Bieth, J. G., and Moreau, T. (2004) *Eur. J. Biochem.* **271**, 2370-2378

30. Schagger, H., and von Jagow, G. (1987) *Anal Biochem* **166**, 368-379
31. Korkmaz, B., Attucci, S., Moreau, T., Godat, E., Juliano, L., and Gauthier, F. (2004) *Am J Respir Cell Mol Biol* **30**, 801-807
32. Bieth, J. G. (1995) *Methods Enzymol* **248**, 59-84
33. Bieth, J. G. (1984) *Biochem. Med.* **32**, 387-397
34. Attucci, S., Korkmaz, B., Juliano, L., Hazouard, E., Girardin, C., Brillard-Bourdet, M., Rehault, S., Anthonioz, P., and Gauthier, F. (2002) *Biochem J* **366**, 965-970
35. Korkmaz, B., Hajjar, E., Kalupov, T., Reuter, N., Brillard-Bourdet, M., Moreau, T., Juliano, L., and Gauthier, F. (2007) *J Biol Chem* **282**, 1989-1997
36. Sharp, K. A., and Honig, B. (1990) *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **19**, 301-332
37. Sallenave, J. M., Si Tahar, M., Cox, G., Chignard, M., and Gauldie, J. (1997) *J Leukoc Biol* **61**, 695-702
38. Sallenave, J. M., Shulmann, J., Crossley, J., Jordana, M., and Gauldie, J. (1994) *Am J Respir Cell Mol Biol* **11**, 733-741
39. Kramps, J. A., van Twisk, C., Appelhans, H., Meckelein, B., Nikiforov, T., and Dijkman, J. H. (1990) *Biochim Biophys Acta* **1038**, 178-185
40. Van-Seuning, I., and Davril, M. (1991) *Biochem Biophys Res Commun* **179**, 1587-1592
41. Grutter, M. G., Fendrich, G., Huber, R., and Bode, W. (1988) *Embo J* **7**, 345-351
42. Nobar, S. M., Zani, M. L., Boudier, C., Moreau, T., and Bieth, J. G. (2005) *Febs J* **272**, 5883-5893
43. Campbell, E. J., Campbell, M. A., and Owen, C. A. (2000) *J Immunol* **165**, 3366-3374
44. Korkmaz, B., Attucci, S., Jourdan, M. L., Juliano, L., and Gauthier, F. (2005) *J Immunol* **175**, 3329-3338
45. Schalkwijk, J., Wiedow, O., and Hirose, S. (1999) *Biochem. J.* **340**, 569-577
46. Norel, R., Sheinerman, F., Petrey, D., and Honig, B. (2001) *Protein Sci* **10**, 2147-2161
47. Sheinerman, F. B., and Honig, B. (2002) *J Mol Biol* **318**, 161-177
48. Sheinerman, F. B., Norel, R., and Honig, B. (2000) *Curr Opin Struct Biol* **10**, 153-159
49. Braden, B. C., and Poljak, R. J. (1995) *FASEB J* **9**, 9-16
50. Epa, V. C., and Colman, P. M. (2001) *Curr Top Microbiol Immunol* **260**, 45-53
51. Moreau, T., and Gauthier, F. (1996) *Protein Eng* **9**, 987-995
52. Villoutreix, B. O., Getzoff, E. D., and Griffin, J. H. (1994) *Protein Sci* **3**, 2033-2044
53. Koizumi, M., Fujino, A., Fukushima, K., Kamimura, T., and Takimoto-Kamimura, M. (2008) *J Synchrotron Radiat* **15**, 308-311
54. Dundas, J., Ouyang, Z., Tseng, J., Binkowski, A., Turpaz, Y., and Liang, J. (2006) *Nucleic Acids Res* **34**, W116-118
55. Buczek, O., Koscielska-Kasprzak, K., Krowarsch, D., Dadlez, M., and Otlewski, J. (2002) *Protein Sci* **11**, 806-819
56. Laskowski, M., Jr., and Kato, I. (1980) *Annu Rev Biochem* **49**, 593-626
57. Otlewski, J., Jaskolski, M., Buczek, O., Cierpicki, T., Czapinska, H., Krowarsch, D., Smalas, A. O., Stachowiak, D., Szpineta, A., and Dadlez, M. (2001) *Acta Biochim Pol* **48**, 419-428
58. Owen, C. A., and Campbell, E. J. (1998) *J Immunol* **160**, 1436-1443
59. Rice, W. G., and Weiss, S. J. (1990) *Science* **249**, 178-181
60. Nara, K., Ito, S., Ito, T., Suzuki, Y., Ghoneim, M. A., Tachibana, S., and Hirose, S. (1994) *J. Biochem.* **115**, 441-448
61. Yoshida, N., Egami, H., Yamashita, J., Takai, E., Tamori, Y., Fujino, N., Kitaoka, M., Schalkwijk, J., and Ogawa, M. (2002) *Oncol. Rep.* **9**, 495-501
62. Muto, J., Kuroda, K., Wachi, H., Hirose, S., and Tajima, S. (2007) *J Invest Dermatol* **127**, 1358-1366

63. Lorand, L., and Graham, R. M. (2003) *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 140-156
64. Maiuri, L., Luciani, A., Giardino, I., Raia, V., Vilella, V. R., D'Apolito, M., Pettoello-Mantovani, M., Guido, S., Ciacci, C., Cimmino, M., Cexus, O. N., Londei, M., and Quarantino, S. (2008) *J Immunol* **180**, 7697-7705
65. Steinert, P. M., and Marekov, L. N. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 17702-17711

FOOTNOTES

Abbreviations used: CatG, human cathepsin G; HNE, human neutrophil elastase; Pr3, proteinase 3; PPE, porcine pancreatic elastase; SLPI, secretory leucocyte protease inhibitor; $K_{i(app)}$, apparent dissociation constant; NSPs, neutrophil serine proteases; PMNs, polymorphonuclear neutrophils; RSL, reactive site loop; TGase, tissue transglutaminase; WT, wild type

Amino acid numbers are followed by I or E if they belong to the inhibitor or enzyme polypeptide chains in protease-inhibitor complexes.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Sequence alignment of the regions surrounding inhibitory loops of elafin and the SLPI1 and SLPI2 domains. P3 to P3' residues of the inhibitory loop are indicated. Residues that are conserved between at least two sequences are colored grey. The amino acids in elafin are numbered according to the trappin-2 sequence.

Figure 2: Diagram of the structures of engineered inhibitors. A) Ribbon representation of the three-dimensional structure of elafin and SLPI extracted from the elafin-PPE complex coordinate file (PDB code: 1FLE) and SLPI-bovine chymotrypsin complex coordinate file (Dr. Bode). The four disulfide bonds in each WAP domain are shown as sticks. The P1 residue in each inhibitory loop is indicated by an asterisk. The figure was generated using PyMOL (<http://www.pymol.org>).

B) Structural organization of chelonianin inhibitors. Elafin is a 57-amino acid inhibitor (HNE and Pr3 inhibitor) derived from its active precursor trappin-2 (95 residues) by a proteolytic cleavage thought to involve mast cell tryptase (16). The N-terminal cementoïn domain of trappin-2 contains several repeated motifs rich in Gln and Lys residues that serve as transglutaminase substrates. The elafin domain is structurally homologous to both the SLPI domains (SLPI1 is N-terminal and SLPI2 is C-terminal). Only SLPI2 is believed to inhibit HNE and CatG, while SLPI1 inhibits trypsin. Also shown are the four disulfide bonds (bold lines) in each inhibitory (WAP) domain and the inhibitory loop of each WAP domain.

C) Structures of the inhibitors designed in this study. SLPI1(Elaf)-SLPI2 corresponds to SLPI in which the inhibitory loop of SLPI1 (amino acids 10 to 26) is replaced by the corresponding region of elafin (54-70). The Elaf-SLPI2 and SLPI2-Elaf chimeras combine the NSP-inhibiting properties of elafin (HNE and Pr3 inhibition) and SLPI2 (HNE and CatG inhibition). Trappin-2 A62L and trappin-2 R60Q/A62L/R69F are trappin-2 mutants in which residues P3, P1 and P7' of the inhibitory loop are replaced by the corresponding residues in SLPI2.

Figure 3: Dose dependent inhibition of membrane-bound NSPs. Curves showing the inhibition of HNE (A), Pr3 (B) and CatG (C) bound to the membrane of activated neutrophils by WT trappin-2, trappin-2 A62L and WT SLPI. Purified PMNs were activated with the calcium ionophore A23187 and then incubated for 30 min at 37°C with various concentrations of inhibitor. The number of cells was adjusted so that the concentration of each protease was 2 nM, as assessed by the hydrolysis of specific fluorogenic substrates. The residual protease activity was measured using specific fluorogenic substrates. Results are expressed as relative activity compared to the control experiment without added inhibitor and are the means $\pm$ SD of five separate experiments.

Figure 4: Sensitivities of membrane-bound NSPs to WT chelonianins and engineered inhibitors derived from elafin/trappin-2 or SLPI. Purified PMNs were activated with the calcium ionophore A23187 and then incubated for 30 min at 37°C with 100 nM of : 1) WT elafin, 2) WT trappin-2, 3) WT SLPI, 4) Elaf-SLPI2, 5) SLPI2-Elaf and 6) trappin-2 A62L variant. Residual enzyme activity of each membrane-bound protease was measured using specific fluorogenic substrates. Data are expressed as percentage of residual enzyme activity (rate of substrate hydrolysis in the presence of inhibitor to the rate of substrate hydrolysis without inhibitor) and are the means of three separate experiments. Like their soluble forms, membrane-bound CatG and Pr3 were not inhibited by WT elafin/trappin-2 or WT SLPI. The engineered inhibitors also inhibited all three serine proteases bound at the surface of neutrophils, as they do the soluble proteases (Table 1).

Figure 5: Inhibition of soluble NSPs by inhibitors cross-linked to fibronectin or elastin by transglutamination. Inhibitors were cross-linked to fibronectin or elastin in 96-well microplates essentially as described in (17). Inhibitors (10^{-6} M) were incubated with tissue transglutaminase for 2 h at 37°C to form conjugated complexes with fibronectin (A, C) or elastin (B, D). The wells were washed thoroughly to remove unreacted products, and incubated with HNE (1 nM), Pr3 (2 nM) or CatG (2 nM) for 15 min at 37°C to allow protease-inhibitor complex formation. Residual enzyme activity was monitored using specific fluorogenic substrates. Representative inhibition curves (substrate hydrolysis expressed as fluorescence units vs time) are shown for the inhibition of HNE by Elaf-SLPI2 or trappin-2 A62L bound to fibronectin (A) or elastin (B). (C), (D), Graph show the residual enzyme activity for various protease-immobilized inhibitor pairs after cross-linking of the inhibitor to fibronectin (C) or elastin (D), calculated as the ratio of the rate of substrate hydrolysis in the presence of inhibitor to the rate of substrate hydrolysis without inhibitor (Control). Data are means $\pm$ SD for three separate experiments. The polyvalent inhibitors, Elaf-SLPI2 and trappin-2 A62L, inhibited all three NSPs when cross-linked to fibronectin or elastin, although Elaf-SLPI2 appeared to be less efficient against Pr3 than against HNE and CatG. As expected elafin and trappin-2 bound to fibronectin or elastin inhibited HNE and Pr3 but not CatG.

Figure 6: Electrostatic surface potentials of various protease-inhibitor complexes involving chelonianins. The atomic coordinates of elafin and SLPI extracted from the elafin-PPE and SLPI-chymotrypsin complexes were used to build theoretical complexes by superimposing elafin or SLPI and CatG or Pr3 onto the inhibitor or protease component of these X-ray complexes. The electrostatic potentials were calculated for the individual molecules of each complex using the Poisson-Boltzmann method implemented in DELPHI assuming a dielectric constant of 2 for the interior of the proteins and 80 for the exterior, an ionic strength of 0.15 M at pH 8.0 and a temperature of 300K. The isopotential contours of positive or negative electrostatic potentials are displayed at $+5 \text{ kTe}^{-1}$ (blue for the protease, cyan for the inhibitor) and -5 kTe^{-1} (red for the protease, magenta for the inhibitor)

respectively. Each complex is displayed with inhibitor at the top and protease at the bottom of each panel. CatG, with a net charge of +23, is entirely covered with a positive potential except for the active site entrance, which is negative, as in most serine proteases. Elafin may be prevented from interacting with CatG (A, B) because of positively charged residues: Arg60I of elafin (trappin-2 numbering) on one side of the complex (A) and Arg69I on the other side overlap with the positive regions of CatG in the reconstructed complex. For clarity, the Connolly surface of elafin is also shown and the CatG structure is shown as a solid ribbon. There are no unfavorable overlaps between SLPI (green ribbon) and CatG (white ribbon) in the reconstructed SLPI-CatG complex (C), despite both proteins having a high positive charge (SLPI net charge +12). Pr3 does not interact with SLPI, although it is almost neutral (net charge +1). The electrostatic contours of each component in the theoretical complex (D) reveal that two positive areas of Pr3, contributed by Arg36E/Arg65E and Lys99E/Arg168E that protrude towards SLPI and overlap with its positive surface. (E, F) the electrostatic contours for elafin and PPE in the X-ray structure of elafin-PPE complex show that complementary (favorable) contacts may help complex formation.

Table 1 : K_i and k_{ass} values for wild-type elafin, trappin-2, SLPI and mutants against different serine proteases. Results are the means of n=3 experiments. For clarity, the standard deviation associated with them are not given, but they are 10% or less.

	Neutrophil elastase		Proteinase 3		Cathepsin G		Porcine pancreatic elastase	
	K_i (M)	k_{ass} ($M^{-1} s^{-1}$)	K_i (M)	k_{ass} ($M^{-1} s^{-1}$)	K_i (M)	k_{ass} ($M^{-1} s^{-1}$)	K_i (M)	k_{ass} ($M^{-1} s^{-1}$)
Elafin	$8.0 \times 10^{-11} a$	$3.7 \times 10^6 a$	$12.0 \times 10^{-11} a$	$3.3 \times 10^6 a$	n.s.i. ^b		$0.75 \times 10^{-9} a$	n.d. ^c
Trappin-2	$3.0 \times 10^{-11} a$	$3.6 \times 10^6 a$	$18.0 \times 10^{-11} a$	$2 \times 10^6 a$	n.s.i. ^b	-	$0.32 \times 10^{-9} a$	n.d. ^c
SLPI	1.8×10^{-11}	5.0×10^7	n.s.i. ^b	-	20.0×10^{-11}	3×10^7	$\geq 50 \times 10^{-9}$	n.d.
Elaf-SLPI2	2.2×10^{-11}	8.0×10^7	7.6×10^{-11}	6.0×10^7	3.9×10^{-11}	4×10^7	6.4×10^{-9}	n.d. ^c
SLPI2-Elaf	5.2×10^{-11}	1.0×10^8	43.0×10^{-11}	5.0×10^7	2.8×10^{-11}	5×10^7	4.0×10^{-9}	n.d. ^c
Trappin-2 A62L	1.5×10^{-11}	2.0×10^8	3.7×10^{-9}	3.0×10^6	6.4×10^{-9}	2×10^7	20.0×10^{-9}	n.d. ^c
Trappin-2 R60Q/A62L/R69F	0.56×10^{-11}	1.0×10^8	n.s.i. ^b	-	3.2×10^{-9}	2×10^7	$\geq 20 \times 10^{-9}$	n.d. ^c

^a Data from (29); ^b n.s.i. : no significant inhibition ; ^c n.d. : not determined

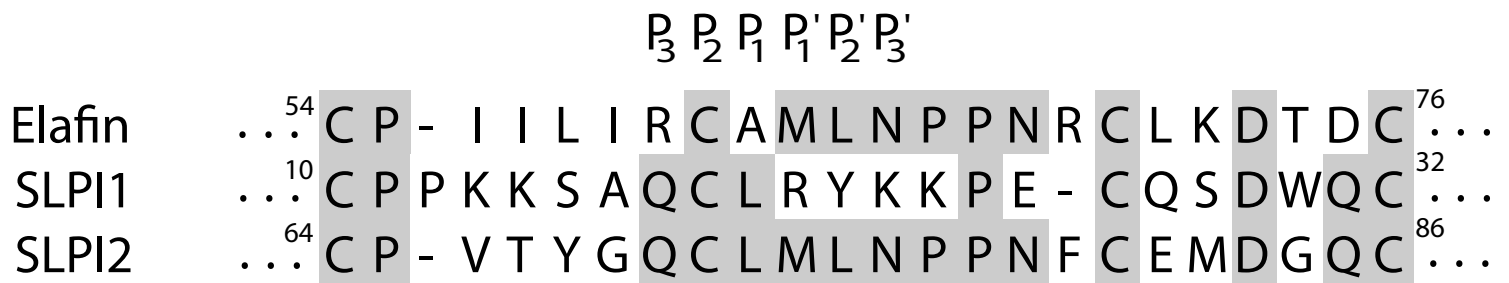


Fig.1: Zani et al.

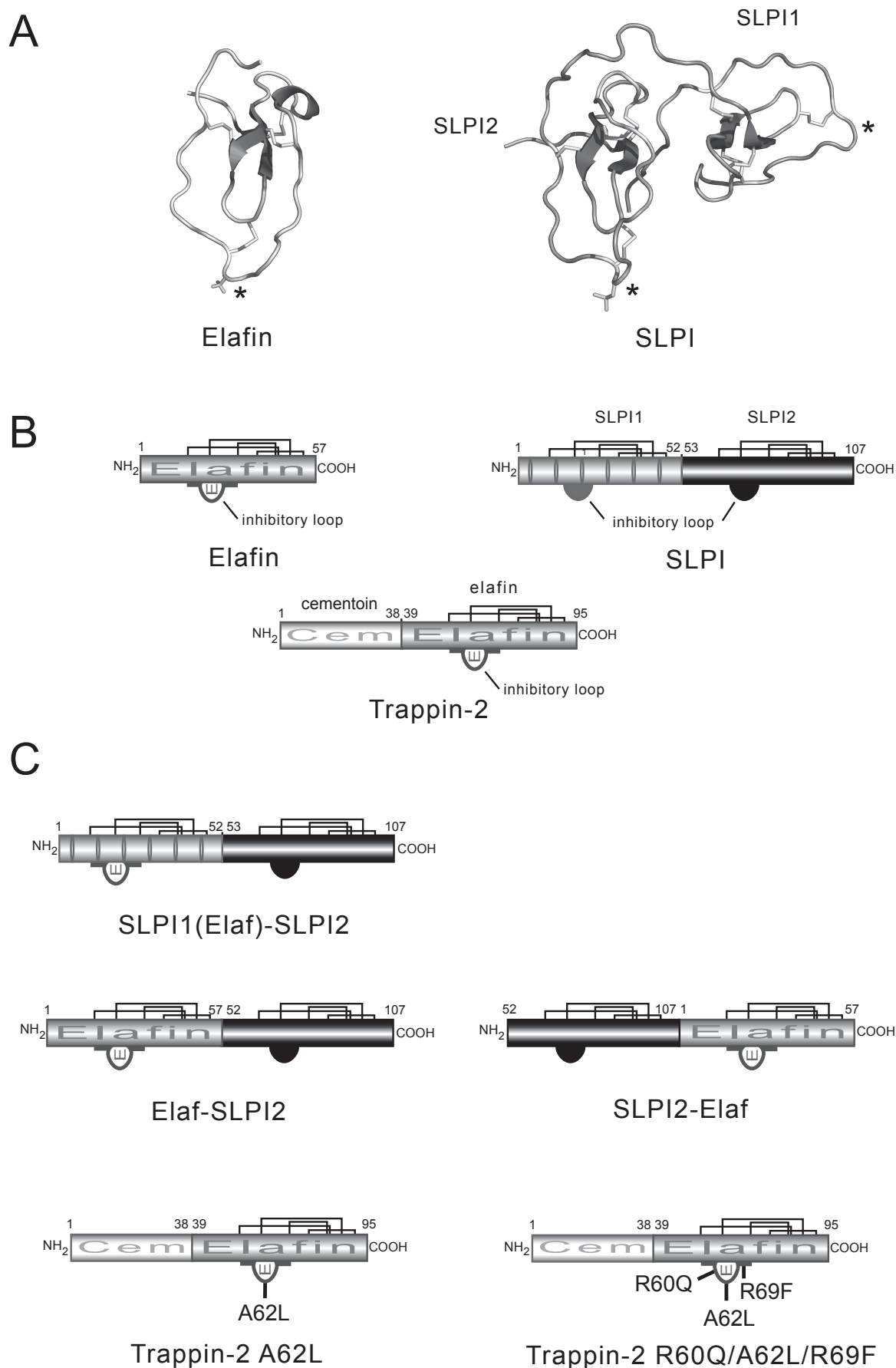


Fig.2: Zani et al.

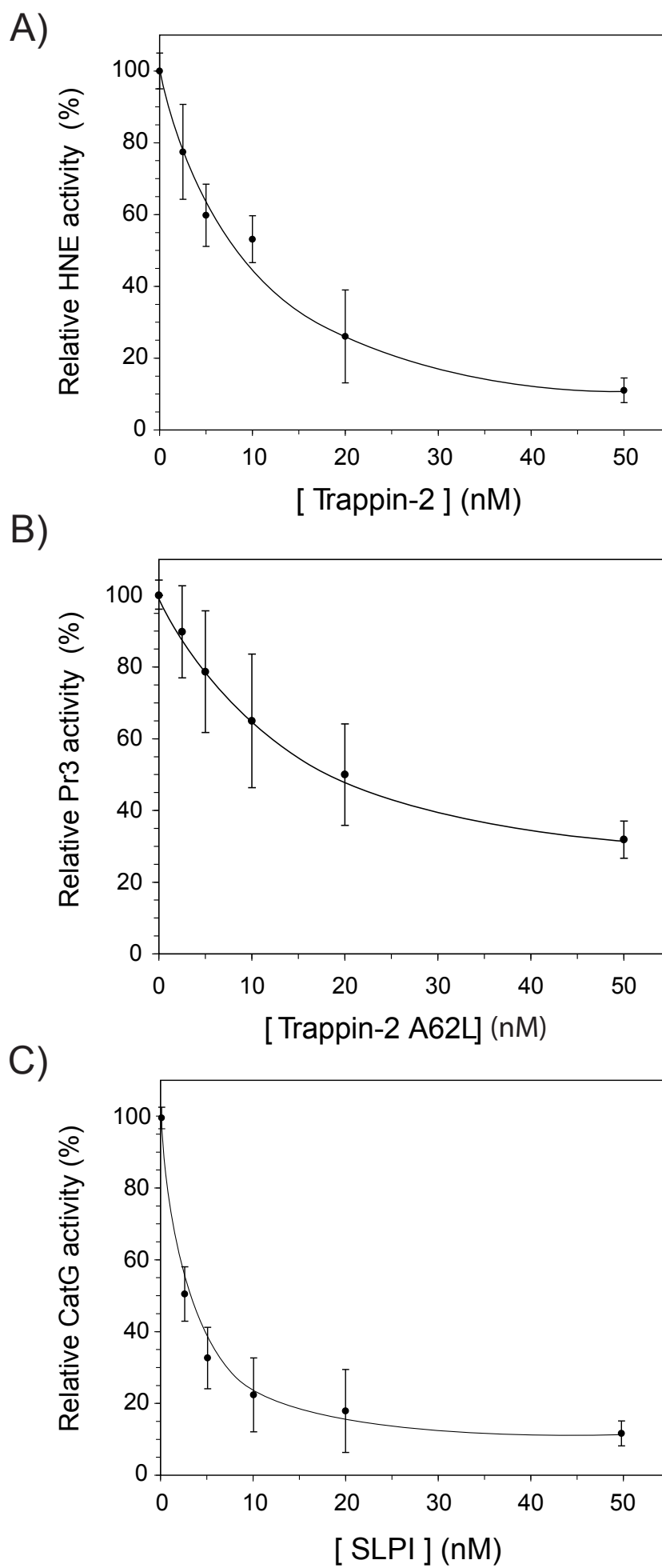


Fig.3: Zani et al.

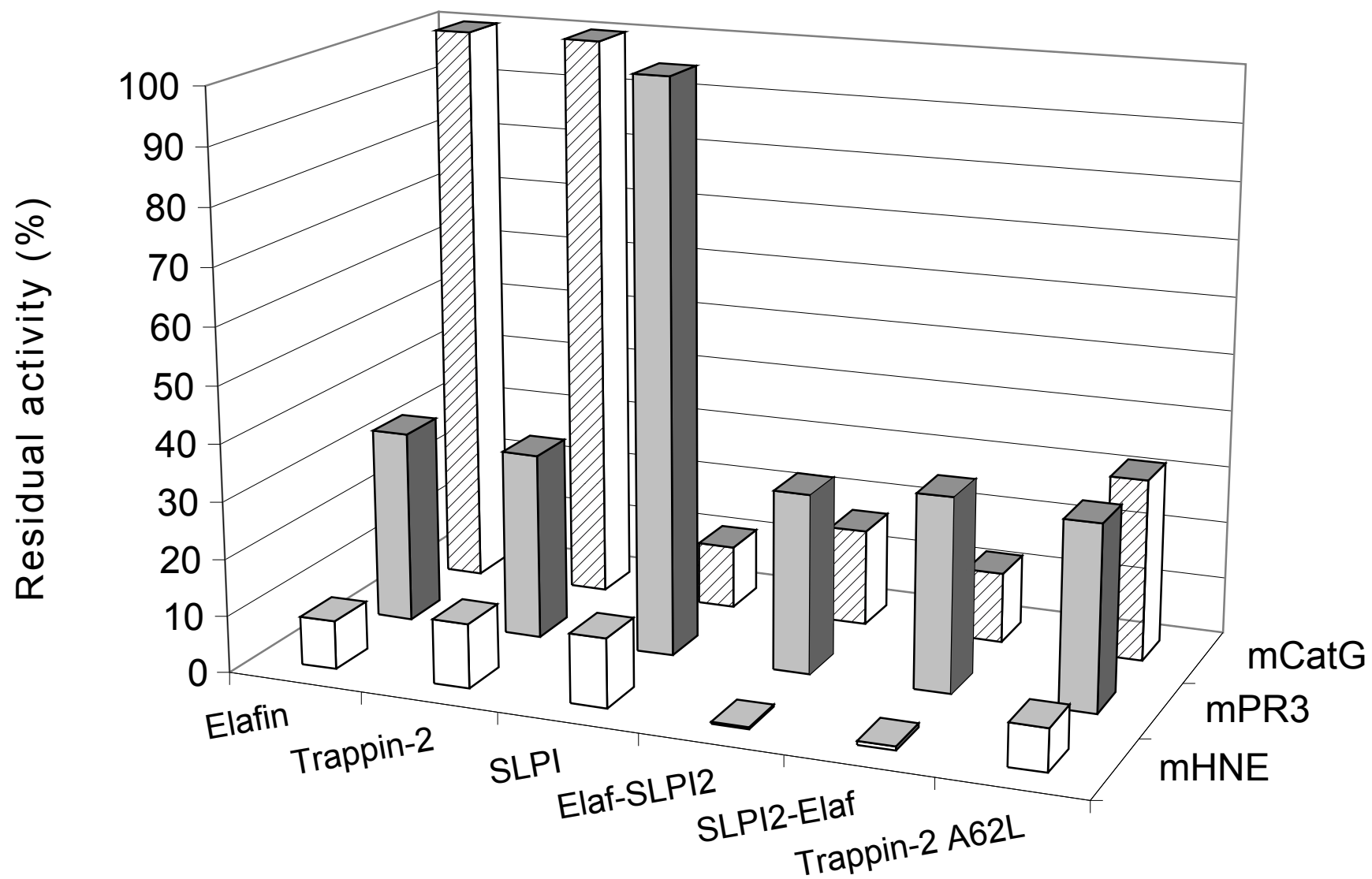


Fig. 4: Zani et al.

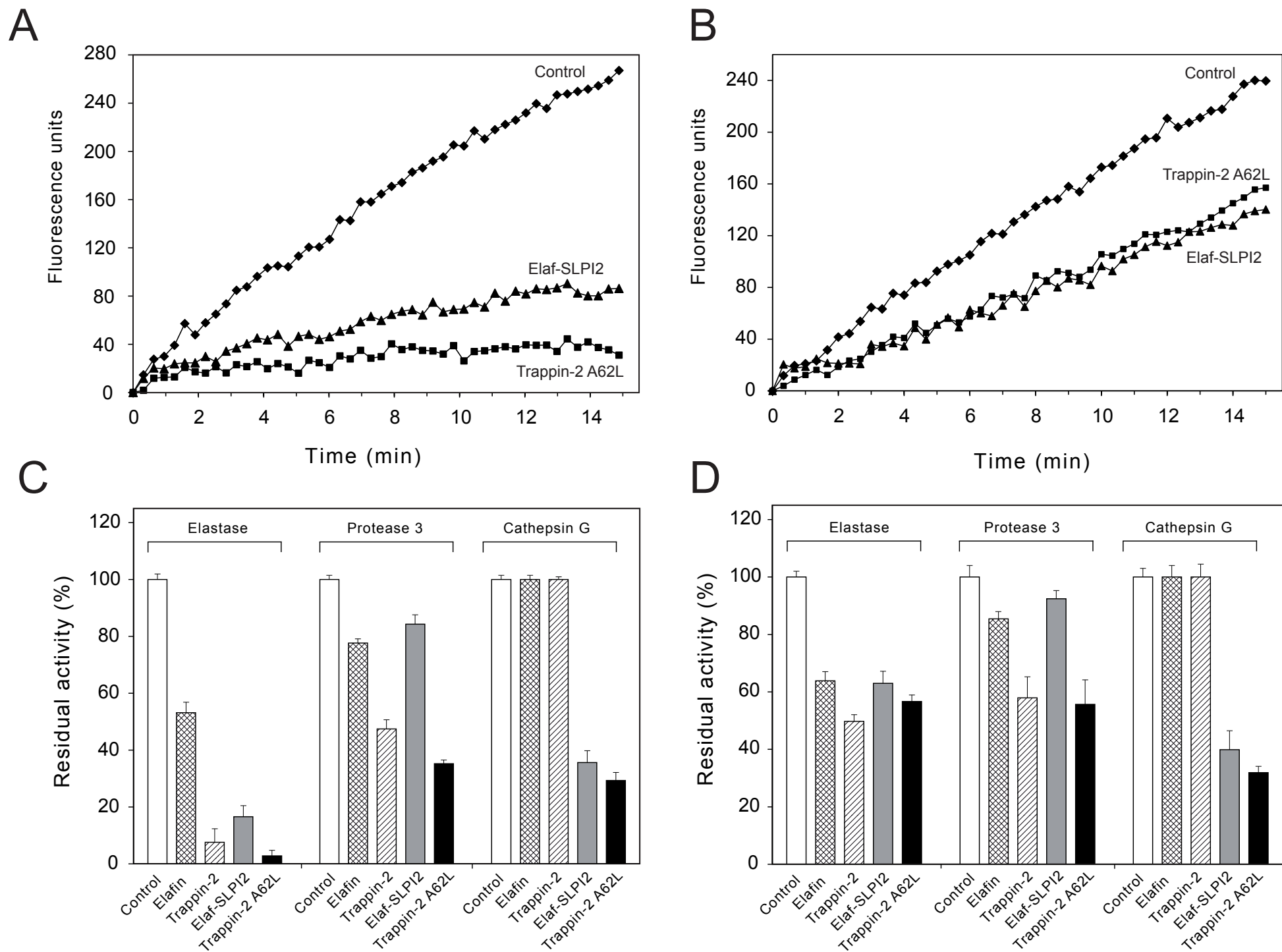


Fig. 5: Zani et al.

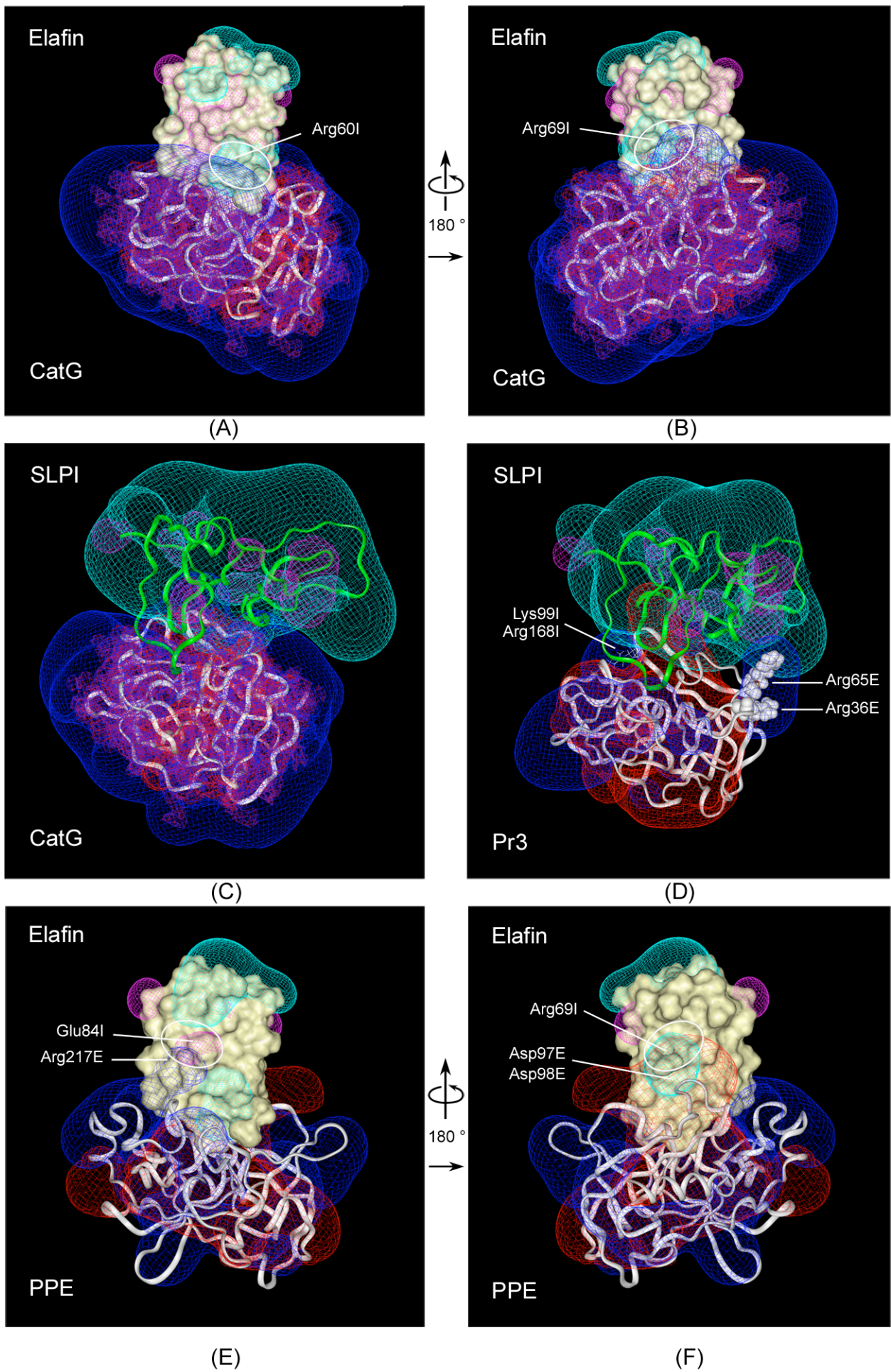


Fig. 6: Zani et al.

Etude des propriétés de transglutamination de l'élafine, de la trappine-2 et du SLPI (Résultats non publiés).

I. Contexte de l'étude

Le domaine cémentoïne est important pour les propriétés de transglutamination (Guyot *et al.*, 2005b) et les propriétés anti-microbiennes de la T2 (Baranger *et al.*, 2008). L'élafine est également substrat de transglutaminase (Guyot *et al.*, 2005b ; Guyot *et al.*, 2008). Une étude récente a montré que la séquence AQEPVK, en N-terminal de l'inhibiteur, est essentielle pour la transglutamination de l'élafine (Guyot *et al.*, 2008).

En réponse aux stimuli pro-inflammatoires, la T2 et le SLPI sont très rapidement libérés dans le milieu extérieur. Une étude a montré que le SLPI pouvait être très rapidement associé aux protéines de la matrice extracellulaire comme l'élastine (Wingens *et al.*, 1998). Cette association serait due à des interactions électrostatiques entre l'inhibiteur cationique et la protéine. Bien que le SLPI ne possède pas de séquence consensus substrat de transglutaminase, nous avons testé si cet inhibiteur, structuralement similaire à l'élafine, est transglutaminable.

Les objectifs de notre étude sont de caractériser les propriétés de transglutamination du SLPI et d'identifier les sites critiques de transglutamination du SLPI, de la T2 et de l'élafine, ce qui permettra d'optimiser les inhibiteurs, en particulier en mutant certaines Lys pour diminuer leur sensibilité à la protéolyse non spécifique sans toutefois altérer leur capacité à être fixés à d'autres protéines.

II. Méthodologie

A. Expériences de transglutamination

L'HNE et l'élastine ont été obtenues chez Elastin Products. La fibronectine chez Sigma-Aldrich. Nous avons utilisé deux transglutaminases différentes. La TGase2 de foie de cobaye (Sigma-Aldrich) et le FXIIIa (Kordia). Nous avons resuspendu ces enzymes dans le tampon d'activité de transglutamination sans DTT (Tris-HCl 50 mM, CaCl₂ 5 mM pH 7,4). Pour activer les deux transglutaminases, on ajoute du DTT dans le tampon d'activité à 0,1 mM final. Le tampon d'activité de l'HNE est le tampon Hépès 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,4 et le substrat utilisé est Abz-APEEIMRRQ-EDDnp à 10 µM.

Nous avons utilisé différentes molécules pour étudier les réactions de transglutamination *in vitro* : la dansyl-cadavérine (DsC) (Sigma-Aldrich) d'une part et des peptides substrats de transglutaminase d'autre part. L'un des peptides est issu de la fibronectine (PGGQQIV) et les deux autres ont été obtenus par phage display et sont spécifiques de la TGase2 (HQSYVDPWMLDH) et de FXIIIa (DQMMLPWPAVAL) (Sugimura *et al.*, 2006).

B. Les inhibiteurs

Le SLPI₂ a été produit en une seule étape de PCR selon le même protocole que celui décrit précédemment. Les amorces suivantes ont été utilisées pour réaliser le clonage de SLPI₂ dans le vecteur pPIC9 :

SLPI₂ (forward) : 5'-CGACTCGAGAAAAGGGATCCTGTTGACACCCC-3'

SLPI₂ (reverse) : 5'-CGAGCGGCCCGCGGAATCAAGCTTTCACAGG-3'

C. Analyse en spectrométrie de masse LC/MS

Les réactions de transglutamination avec la DsC et le peptide PGGQQIV ont été analysées en LC/MS. Les échantillons sont soniqués quelques minutes avant le dépôt sur la cible. 1 µL d'échantillon dilué a été déposé sur la cible avec 1 µL de matrice selon la méthode de dépôt dite de la goutte séchée. La matrice utilisée est une solution de CHCA (Acide α-Cyano-4-Hydroxy-Cinnamique) à 5 mg/mL dans 50% éthanol/50% acétonitrile/TFA 0.1%/10 mM de 18-C-6 éther-couronne. L'appareil MALDI-TOF a été calibré en externe à l'aide de peptides issus de la digestion tryptique de la BSA (*Bovine Serum Albumin*). 1 µL d'une solution peptidique à 500 fmol/µL a été déposé avec la matrice CHCA.

Les spectres MALDI-TOF sont obtenus à l'aide d'un spectromètre de masse M@LDI-TOF LR (Waters, Manchester, UK). Les analyses ont été réalisées : en mode positif, en mode réflectron, avec une tension d'accélération de 15 KV, un Pulse Voltage : 2350 sur une gamme de masse de 500 Da à 3500 Da. Ces différentes analyses ont été réalisées au sein de la plateforme de spectrométrie de masse de l'INRA de Nouzilly.

III. Résultats

A. Caractérisation *in vitro* des propriétés de transglutamination de l'élafine et de la T2

Dans un premier temps, nous avons cherché à comparer *in vitro* les propriétés de transglutamination de l'élafine et de la T2. Nous avons utilisé différentes molécules pour caractériser l'implication des résidus Lys et Gln dans la réaction de transglutamination. Parmi ces molécules, nous avons testé la dansyl-cadavérine (DsC), qui présente un groupement amine libre (Figure 40), qui va pouvoir réagir avec la chaîne latérale d'une Gln. Nous avons également testé différents peptides, connus pour être des substrats de la TGase2 et du FXIIIa. Tous ces substrats possèdent des Gln réactives qui vont pouvoir réagir avec les Lys des inhibiteurs. Nous avons utilisé un peptide dérivé de la séquence de la fibronectine PGGQQIV (TG1) et deux peptides obtenus par phage display : HQSYVDPWMLDH (TG2) et DQMMLPWPAVAL (TG3) (Sugimura *et al.*, 2006). Bien que les peptides TG2 et TG3 soient les substrats les plus spécifiques pour la TGase2 et le FXIIIa, il semble que le peptide TG2 puisse tout de même interagir avec le FXIIIa et que le peptide TG3 puisse interagir avec la TGase2 (Sugimura *et al.*, 2006).

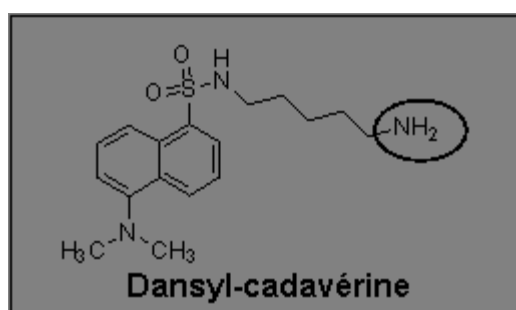


Figure 40 : Structure de la dansyl-cadavérine.

Nous avons incubé ces différentes molécules à l'élafine et à son précurseur la T2 en présence de TGase2 puis nous avons séparé nos échantillons par électrophorèse SDS-PAGE haute résolution (Figure 41). En présence de TGase2, l'élafine forme un complexe d'environ 12 kDa (piste 2), qui correspond à l'association de deux molécules d'élafine, et des complexes de masses supérieures à 17 kDa. En présence de DsC (piste 3), il y a également formation de complexes mais ces derniers ne sont pas identiques à ceux formés en l'absence de DsC. En présence du peptide TG1 à 1,2 et 2,4 mM, la réaction de transglutamination de l'élafine est totalement inhibée, ce qui suggère que des Lys de l'élafine sont impliquées dans cette

réaction. Cette observation est confirmée avec l'utilisation du peptide TG2. A 1,2 mM (piste 6), les complexes élafine-élafine formés sont identiques à ceux formés en l'absence de peptides (piste 2). En revanche, lorsque la concentration en peptide TG2 est doublée (piste 7), la formation de complexe est totalement inhibée. Ces résultats confirment l'implication d'une ou plusieurs Lys dans la réaction de transglutamination de l'élafine. Avec le peptide TG3, spécifique du FXIIIa et mauvais substrat de la TGase2, il y a formation de complexes élafine-élafine de masse supérieure à 17 kDa (piste 8) inhibée lorsque la concentration en TG3 est doublée (piste 9), ce qui suggère que ce peptide peut être fixé à l'élafine sous l'action de TGase2 et peut inhiber la réaction de transglutamination. L'élafine possède une séquence consensus de transglutamination, A₁QEPVK₆. Dans leur étude, Sugimura *et al.*, ont montré que les peptides TG2 et TG3 se fixent peu ou pas sur le peptide GQDPVK, issu du domaine cémentoïne de la T2 (Sugimura *et al.*, 2006). Or dans notre étude, ces deux peptides inhibent complètement la formation de complexes élafine-élafine, ce qui suggère que la Lys de la séquence AQEPVK peut être un site accepteur d'acyl ainsi que les trois autres Lys présentes dans l'inhibiteur.

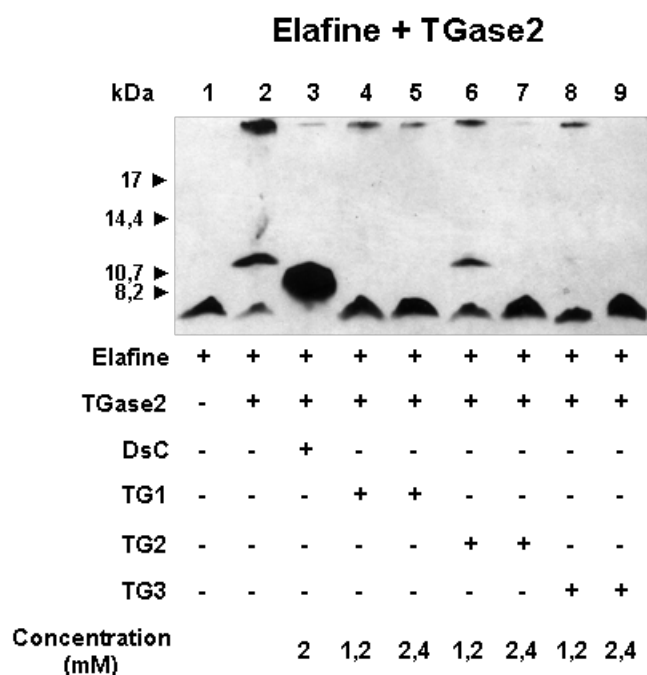


Figure 41 : Réaction de transglutamination *in vitro* de l'élafine avec la TGase2. Les complexes ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE haute résolution et détectés avec des anticorps anti-T2 après transfert. 1. Elafine seule, 2. Elafine + TGase2, 3. Elafine + TGase2 + DsC (2 mM), 4. Elafine + TGase2 + TG1 (1,2 mM), 5. Elafine + TGase2 + TG1 (2,4 mM), 6. Elafine + TGase2 + TG2 (1,2 mM), 7. Elafine + TGase2 + TG2 (2,4 mM), 8. Elafine + TGase2 + TG3 (1,2 mM), 9. Elafine + TGase2 + TG3 (2,4 mM).

En ce qui concerne la T2 (Figure 42), la TGase2 permet la formation de complexes de masses supérieures à 14 kDa (piste 2). La T2 native est fortement diminuée, ce qui signifie que la T2 se complexe très facilement sur elle-même en présence de TGase2. En présence de DsC, comme observé pour l'élafine, la formation des complexes T2-T2 est modifiée, ce qui suggère que des Gln sont impliquées dans la formation de ces complexes. En présence des trois peptides TG1, TG2 et TG3 (1,2 mM), il y a apparition de complexes de plus hautes masses (pistes 4, 6 et 8). Lorsque la concentration en peptide est doublée, il semble que la formation de ces complexes est diminuée et que l'on retrouve la forme native de la T2, ce qui suggère que des Lys sont impliquées dans la réaction de transglutamination. Il est à noter qu'*in vivo*, Steinert et Marekov ont montré que seules trois Lys et deux Gln de la T2 sont impliquées dans la réaction de transglutamination (Steinert et Marekov, 1995) malgré la présence de 6 Gln et 11 Lys au total.

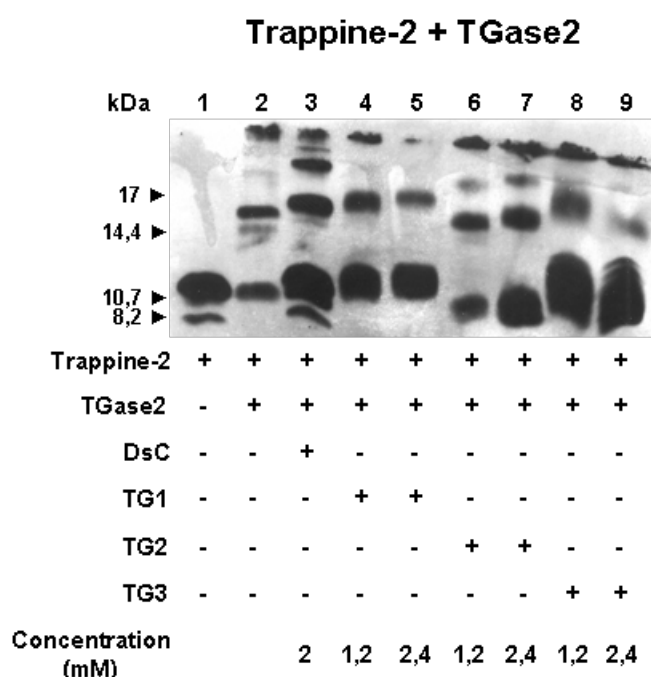


Figure 42 : Réaction de transglutamination *in vitro* de la trappine-2 avec la TGase2. Les complexes ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE haute résolution et détectés avec des anticorps anti-T2 après transfert. 1. T2 seule, 2. T2 + TGase2, 3. T2 + TGase2 + DsC (2 mM), 4. T2 + TGase2 + TG1 (1,2 mM), 5. T2 + TGase2 + TG1 (2,4 mM), 6. T2 + TGase2 + TG2 (1,2 mM), 7. T2 + TGase2 + TG2 (2,4 mM), 8. T2 + TGase2 + TG3 (1,2 mM), 9. T2 + TGase2 + TG3 (2,4 mM).

Dans notre étude, en comparant les profils des complexes formés avec l'élafine et la T2, nous pouvons en conclure que la T2 est un meilleur substrat de TGase2 que l'élafine. Le domaine cémentoïne apporte des sites supplémentaires potentiels de donneurs et d'accepteurs

d'acyl (4 Gln et 6 Lys) pour la réaction de transglutamination, ce qui explique qu'en présence de DsC ou des peptides TG1, TG2 et TG3, la formation des complexes T2-T2 n'est que peu affectée comparée à celle des complexes élafine-élafine. La TGase2 peut donc utiliser des sites de transglutamination du domaine cémentoïne, ce qui confirme l'intérêt d'utiliser des inhibiteurs, en thérapie anti-inflammatoire, possédant un domaine cémentoïne comme la T2 ou la T2 A62L.

B. Caractérisation *in vitro* des propriétés de transglutamination du SLPI avec la TGase2

Il a été décrit que le SLPI pouvait être associé aux fibres d'élastine mais aucune étude n'a évalué le potentiel de transglutamination de cet inhibiteur malgré la similarité structurale avec l'élafine. Bien qu'il ne possède pas de séquence consensus substrat de transglutaminase, GQDPVK, le SLPI possède la séquence suivante, W₃₀QCPGK₃₅ dans le domaine 1 qui présente une similarité de séquence avec le motif consensus.

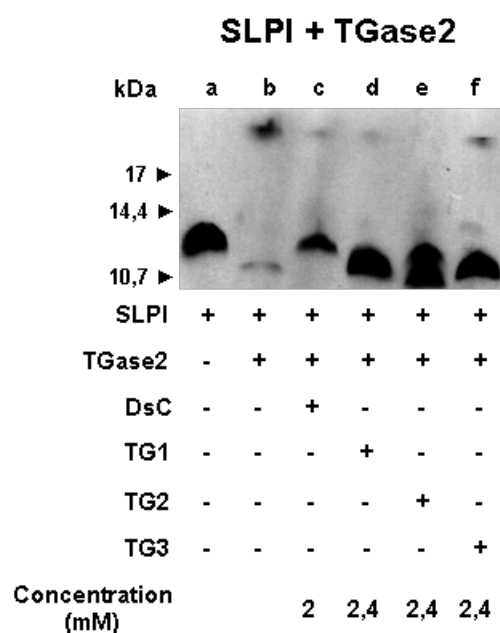


Figure 43 : Réaction de transglutamination *in vitro* du SLPI avec la TGase2. Les complexes ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE haute résolution et détectés avec des anticorps anti-SLPI après transfert. a. SLPI seul, b. SLPI + TGase2, c. SLPI + TGase2 + DsC (2 mM), d. SLPI + TGase2 + TG1 (2,4 mM), e. SLPI + TGase2 + TG2 (2,4 mM), f. SLPI + TGase2 + TG3 (2,4 mM).

Comme pour l'élafine et la T2, nous avons testé les capacités de transglutamination du SLPI et l'influence de la DsC et des peptides TG1, TG2 et TG3 en présence de TGase2

(Figure 43). On observe, en présence de TGase2, la formation de complexes de hautes masses supérieures à 17 kDa (piste b). Il semble que la plupart des molécules de SLPI soient impliquées dans la formation de ces complexes. En présence de DsC, on inhibe presque totalement la formation des complexes (piste c). Comme observé en présence de DsC, le peptide TG1 (2,4 mM) inhibe la formation des complexes SLPI-SLPI (piste d). Avec les peptides TG2 et TG3, il semblerait qu'il y ait une petite quantité de complexes formés. Ces résultats suggèrent que, comme la T2 et l'élafine, le SLPI est substrat de transglutaminase. Des Gln et des Lys de l'inhibiteur semblent être impliquées dans cette réaction.

Nous décrivons pour la première fois que le SLPI peut être substrat de transglutaminase. Ces propriétés de transglutamination font intervenir à la fois des Gln et des Lys, présentes au nombre de 5 et 13 dans l'inhibiteur, respectivement. En ciblant les Gln avec de la DsC ou les Lys avec les différents peptides, la formation de complexes SLPI-SLPI est inhibée. En comparant les résultats obtenus avec l'élafine et la T2, il apparaît clairement que le SLPI est un moins bon substrat de TGase2 que les deux autres inhibiteurs.

C. Compétition pour la fixation du SLPI et de la T2 sur différents substrats protéiques

Nous nous sommes intéressés à la capacité du SLPI à entrer en compétition avec la T2 pour la fixation sur l'élastine et la fibronectine pour savoir si les sites de transglutamination des inhibiteurs sur ces protéines sont identiques ou non.

Le SLPI peut se fixer sur l'élastine et sur la fibronectine en présence de TGase2 (Figure 44, A et B, piste SLPI). Lorsque le SLPI est en compétition avec des concentrations croissantes de T2 (pistes 1 à 5), sa fixation ne semble pas être influencée, ce qui signifie que le SLPI et la T2 ne possèdent pas les mêmes sites de transglutamination sur l'élastine (Figure 44, A) et la fibronectine (Figure 44, B).

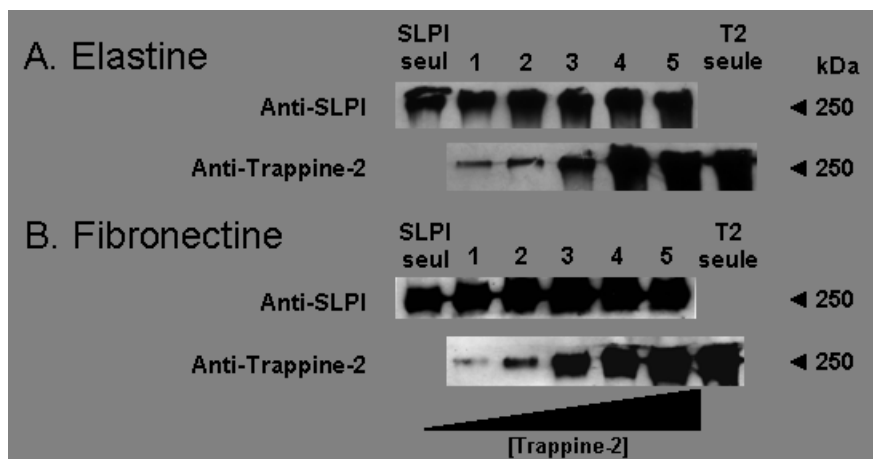


Figure 44 : Compétition entre la trappine-2 et le SLPI pour la fixation sur l'élastine et la fibronectine sous l'action de la TGase2. Les complexes ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE 10% et détectés avec des anticorps anti-SLPI et anti-T2 après transfert. A. Elastine, B. Fibronectine. La concentration de SLPI est fixe ($3 \cdot 10^{-6}$ M) et la concentration de T2 est croissante : piste 1 : $3 \cdot 10^{-7}$ M, piste 2 : $6 \cdot 10^{-7}$ M, piste 3 : $1,2 \cdot 10^{-6}$ M, piste 4 : $3 \cdot 10^{-6}$ M et piste 5 : $7 \cdot 10^{-6}$ M (piste SLPI : $3 \cdot 10^{-6}$ M et piste T2 : $7 \cdot 10^{-6}$ M).

Avec cette étude, nous avons montré que le SLPI peut se fixer de façon covalente, sous l'action de la TGase2, à l'élastine et à la fibronectine. La fixation du SLPI sur ces deux protéines n'est pas influencée par les concentrations croissantes en T2 (Figure 44). Les complexes inhibiteurs/élastine et inhibiteurs/fibronectine détectés, ont des masses d'environ 250 kDa. Dans ces conditions, il semble n'y avoir qu'un seul site de fixation pour le SLPI et la T2 sur les deux protéines.

D. Analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF des produits de réaction de transglutamination

Nous avons analysé, par spectrométrie de masse LC/MS MALDI-TOF, les produits de réaction de transglutamination de l'élafine, de la T2 et du SLPI avec de la DsC ou du peptide TG1. Ces expériences vont nous permettre de déterminer le nombre de résidus impliqués dans cette réaction et d'identifier les sites de transglutamination sur les trois inhibiteurs.

En ce qui concerne l'élafine, en présence de TGase2 et de DsC, deux modifications ont été détectées (Figure 45, B). Un pic majeur correspondant à la fixation d'une seule molécule de DsC (+318 Da) et un autre pic, de plus faible intensité qui correspond à l'addition de deux molécules de DsC. Ces résultats suggèrent que deux Gln de l'élafine sont impliquées dans la réaction de transglutamination avec la DsC. Avec le peptide TG1, comme pour la DsC, deux pics ont été détectés dont un pic majoritaire (+682 Da) (Figure 45, C). Ceci nous laisse penser que deux molécules de peptide peuvent se fixer sur l'élafine. Sur les quatre

Lys de l'élafine, deux d'entre elles seraient substrat de la TGase2. Dans la littérature, seule la Lys de la séquence A₁QEPVK₆ est impliquée dans les réactions de transglutamination *in vivo* au niveau de la couche cornée (Steinert et Marekov, 1995) (Figure 27). Afin d'identifier les lysines impliquées dans cette réaction, l'analyse des produits de réactions, hydrolysés par la trypsine, est actuellement en cours.

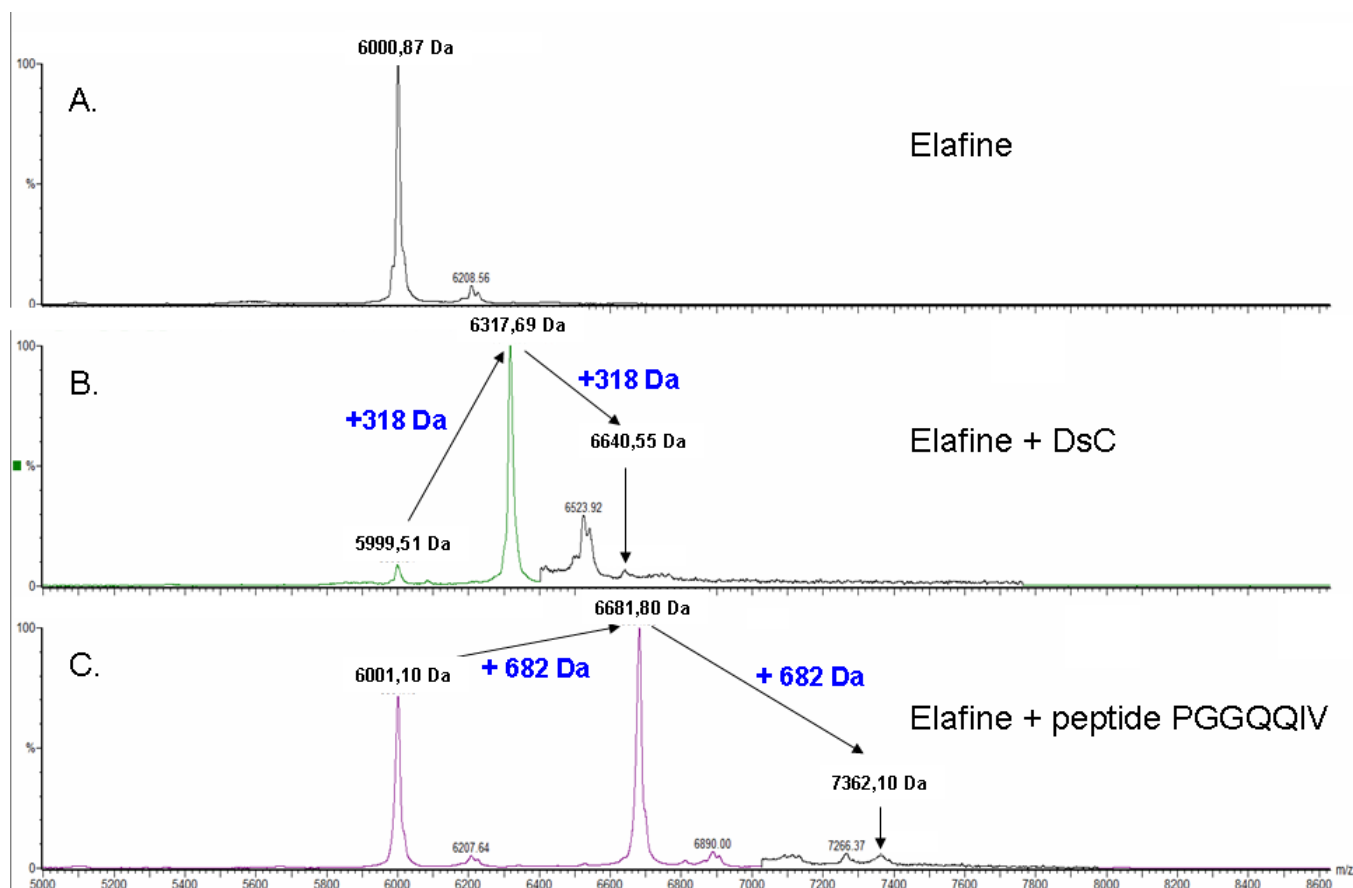


Figure 45 : Analyse en MALDI-TOF de l'élafine seule (A), de l'élafine couplée à la DsC (B) et de l'élafine couplée au peptide PGGQQIV (C) par transglutamination. +318 Da et +682 Da correspondent à la fixation par transglutamination d'une molécule de DsC et d'une molécule de peptide PGGQQIV respectivement.

En ce qui concerne la T2, nous avons procédé de la même façon. Nous avons analysé les profils de masse des produits de réaction en présence de TGase2 et de DsC (Figure 46). Avec la DsC, on distingue de nombreuses modifications. Six pics apparaissent avec des masses de 318 et 335 Da d'écart. L'écart de 318 Da correspond à la fixation d'une molécule de DsC sur l'inhibiteur. 335 Da correspond à la fixation d'une molécule de DsC sur la T2 dont une des méthionines est oxydée (+16 Da, méthionine sulfoxyde).

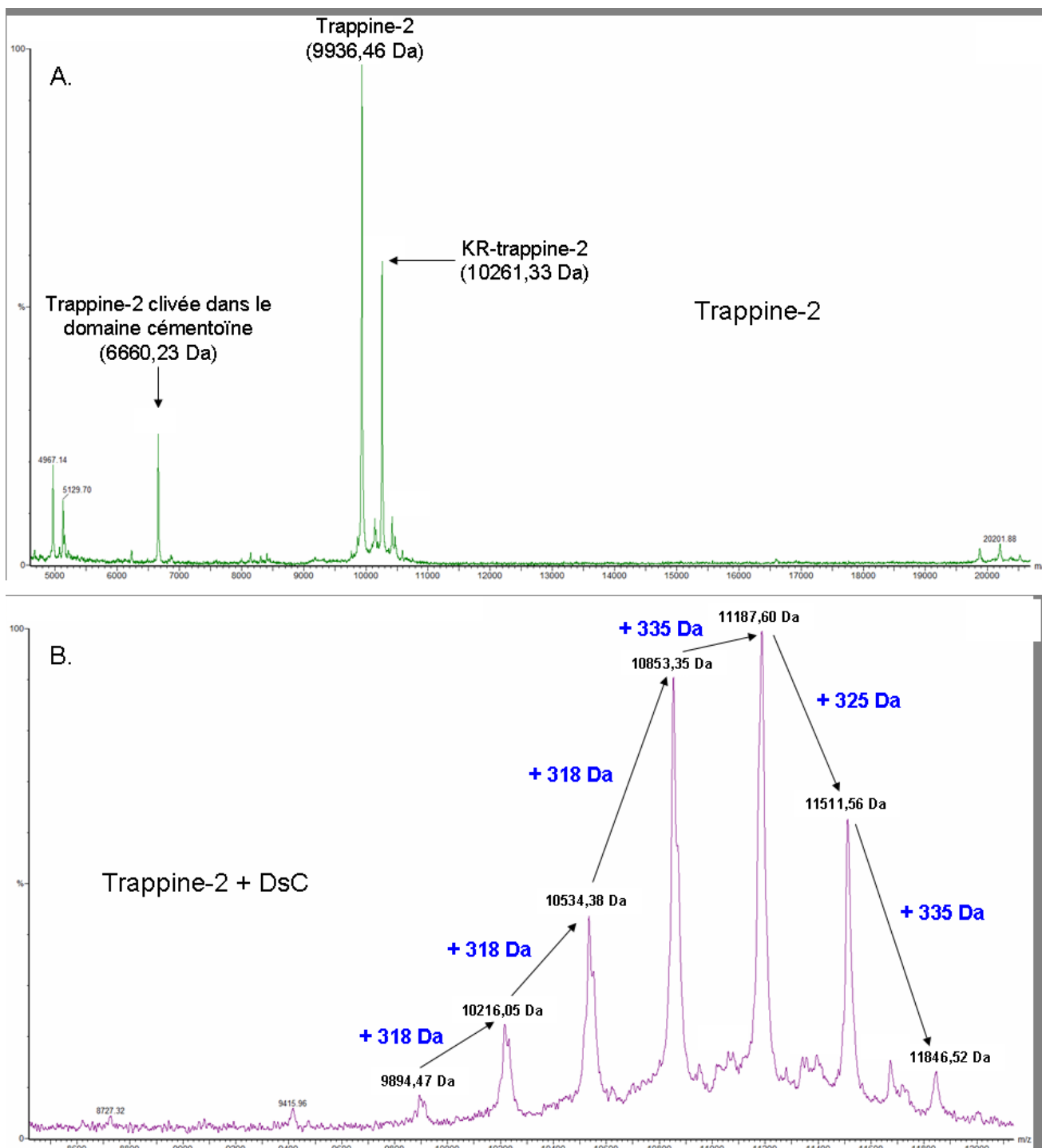


Figure 46 : Analyse en MALDI-TOF de la trappine-2 seule (A) et de la trappine-2 couplée à la DsC (B) par transglutamination. +318 Da correspond à la fixation par transglutamination d'une molécule de DsC sur la T2. +335 Da correspond à la fixation par transglutamination d'une molécule de DsC sur la T2 oxydée (+16 Da). KR-trappine-2 : trappine-2 mal maturée, possédant les deux derniers acides aminés du peptide signal de sécrétion (KR).

La T2 possède deux résidus Met ainsi que 6 Gln, ce qui signifie que comme pour l'élafine, toutes les Gln peuvent être utilisées comme substrat de TGase2 bien que trois,

seulement, aient été décrites dans l'étude de Steinert et Marekov (Steinert et Marekov, 1995) (Figure 27). Ces résultats sont cependant préliminaires. Les profils de masse des produits de réaction de la T2 et du peptide TG1 en présence de TGase2 ainsi que les digestions trypsiques de ces produits de réaction sont actuellement en cours d'analyse.

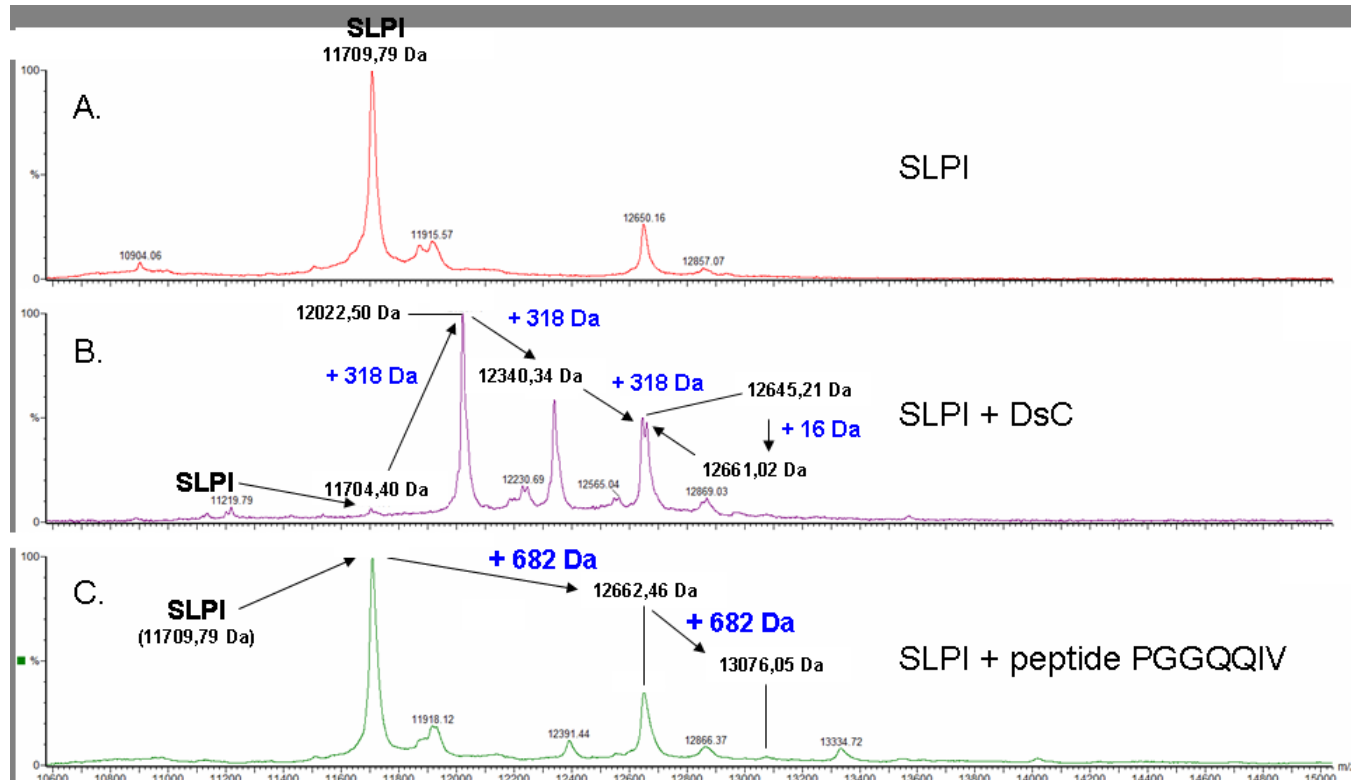


Figure 47 : Analyse en spectrométrie de masse MALDI-TOF du SLPI seul (A), du SLPI couplé à la DsC (B) et du SLPI couplé au peptide TG1 (C) en présence de TGase2. +318 Da et +682 Da correspondent à la fixation par transglutamination d'une molécule de DsC et d'une molécule de peptide respectivement.

Nous avons également analysé les produits de réaction de transglutamination du SLPI avec de la DsC ou le peptide TG1 en présence de TGase2 (Figure 47). En présence de DsC, nous avons détecté la présence de trois pics additionnels dont les masses correspondent à l'addition de trois molécules de DsC (Figure 47, B). Ceci suggère que trois Gln du SLPI peuvent être impliquées dans la réaction de transglutamination avec la DsC. Nous avons également détecté la présence d'une oxydation sur la même molécule de SLPI (masse 12661,02 Da). Il est à noter que le SLPI possède 5 Gln et 4 Met. Toutes les Gln ne sont pas substrats de la TGase2. Avec le peptide TG1, deux pics majeurs ont été détectés et peut être un troisième (des études complémentaires sont en cours) (Figure 47, C). Ces pics signifient que deux ou trois Lys parmi les 13 du SLPI sont impliquées dans les réactions de transglutamination. Afin d'identifier les résidus impliqués dans cette réaction, l'analyse des produits de réaction, digérés par la trypsine, est actuellement en cours.

E. Caractérisation *in vitro* des propriétés de transglutamination de l'élafine, de la T2 et du SLPI avec le FXIIIa

Bien que le FXIIIa ne possède pas la même spécificité de substrat que la TGase2 (Sugimura *et al.*, 2006), nous avons tout de même testé l'effet de cette transglutaminase sur les trois inhibiteurs, l'élafine, la T2 et le SLPI ainsi que l'influence de la DsC et des peptides TG1, TG2 et TG3.

L'élafine est un mauvais substrat de transglutamination pour le FXIIIa (Figure 48, A). En effet, en présence de cette transglutaminase très peu de complexes de hautes masses sont formés (piste 2). La faible activité de transglutamination est totalement inhibée en présence de DsC (piste 3), des peptides TG2 et TG3 (pistes 5, 6, 7). Le peptide TG1 (piste 4) ne semble pas influencer la réaction de transglutamination puisqu'on observe le même profil que sur la piste 2.

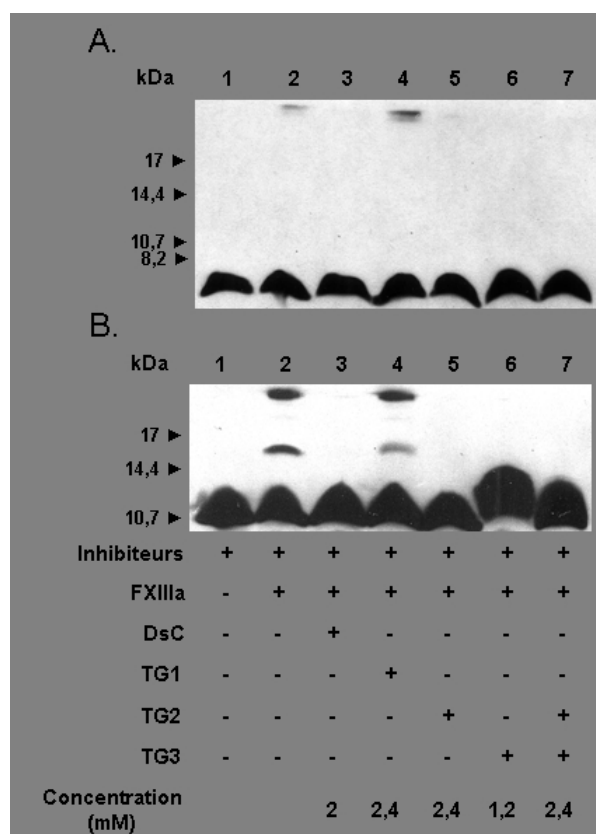


Figure 48 : Réaction de transglutamination *in vitro* de l'élafine (A) et de la trappine-2 (B) avec le FXIIIa. Les complexes ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE haute résolution et détectés avec des anticorps anti-T2 après transfert. 1. Inhibiteur seul, 2. Inhibiteur + FXIIIa, 3. Inhibiteur + FXIIIa + DsC (2 mM), 4. Inhibiteur + FXIIIa + TG1 (2,4 mM), 5. Inhibiteur + FXIIIa + TG2 (2,4 mM), 6. Inhibiteur + FXIIIa + TG3 (1,2 mM), 7. Inhibiteur + FXIIIa + TG3 (2,4 mM).

La T2 semble être un bon substrat pour le FXIIIa (Figure 48, B). En effet, on observe clairement la formation de complexes de plus haute masse (environ 15 kDa et supérieure à 17 kDa) (piste 2). La formation des complexes est inhibée en présence de DsC (piste 3) ou des peptides TG2 et TG3 à 2,4 mM (pistes 5, 7). Le peptide TG1 (piste 4) ne semble pas influencer la réaction de transglutamination puisque l'on observe le même profil que sur la piste 2. En présence du peptide TG3 à 1,2 mM (piste 6), la masse de la T2 semble être légèrement augmentée, ce qui suggère que des molécules de peptides se fixent sur l'inhibiteur. Nous montrons pour la première fois que l'élafine et la T2 sont substrats du FXIIIa. Il semble que la T2 soit un meilleur substrat que l'élafine pour cette transglutaminase, ce qui suggère que le domaine cémentoïne est impliqué dans la réaction de transglutamination. Comme pour la TGase2, il semble que des Gln et des Lys de ces inhibiteurs sont impliquées dans cette réaction.

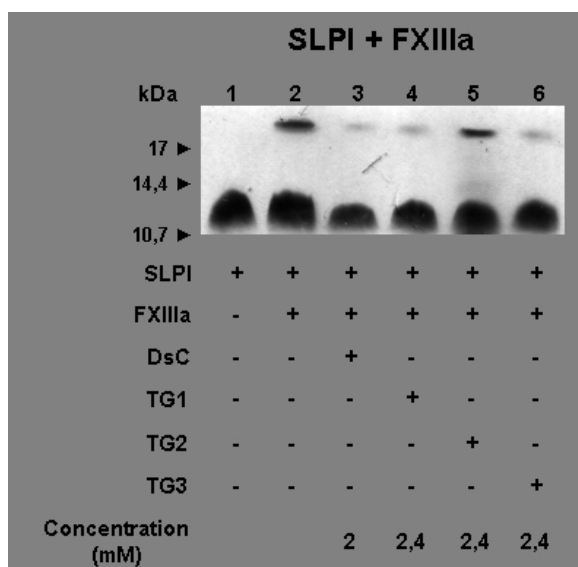


Figure 49 : Réaction de transglutamination *in vitro* du SLPI avec le FXIIIa. Les complexes ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE haute résolution et détectés avec des anticorps anti-SLPI après transfert. 1. SLPI seul, 2. SLPI + FXIIIa, 3. SLPI + FXIIIa + DsC (2 mM), 4. SLPI + FXIIIa + TG1 (2,4 mM), 5. SLPI + FXIIIa + TG2 (2,4 mM), 6. SLPI + FXIIIa + TG3 (2,4 mM).

Les mêmes expériences ont été réalisées avec le SLPI (Figure 49). En présence de FXIIIa, on observe la formation de complexe de haute masse (piste 2). La présence de DsC ou des peptides TG1 et TG3 semble diminuer la formation des complexes SLPI-SLPI (piste 3, 4, 6). En revanche, avec le peptide TG2, la formation de ces complexes n'est pas affectée (piste 5), ce qui suggère que ce peptide est un mauvais substrat de cette transglutaminase.

Comme pour la TGase2, des Lys et des Gln sont impliquées dans les réactions de transglutamination en présence de FXIIIa. Parmi les trois inhibiteurs testés, la T2 semble être

le meilleur substrat pour cette transglutaminase. Le domaine cémentoïne doit jouer un rôle important puisque l'élafine semble être un moins bon substrat que la T2. Le SLPI est également substrat du FXIIIa. Il semble être moins sensible à la DsC et aux trois peptides testés que la T2 car en présence de ces trois molécules, on observe la formation de complexes SLPI-SLPI.

Puisque la T2 et le SLPI peuvent être substrats du FXIIIa *in vitro*, nous avons testé la capacité de ces inhibiteurs à se fixer sur la fibronectine, lorsqu'ils sont en compétition, en présence de cette transglutaminase (Figure 50). Comme pour la TGase2, le SLPI et la T2 sont capables de se fixer sur la fibronectine sous l'action de cette transglutaminase. Lorsque le SLPI est en compétition avec des concentrations croissantes de T2 (pistes 1 à 5), sa fixation ne semble pas être influencée, ce qui signifie que le SLPI et la T2 ne possèdent pas les mêmes sites de transglutamination sur la fibronectine (Figure 50). De plus, il semble que la fibronectine présente plusieurs sites de transglutamination, compris entre 150 et 250 kDa, pour ces deux inhibiteurs en présence de cette transglutaminase. En effet, comme pour la TGase2, on détecte des complexes SLPI/fibronectine et T2/fibronectine d'environ 250 kDa. Ces complexes sont majoritaires pour la T2 alors que les complexes majoritaires pour le SLPI ont une masse d'environ 180 kDa (Figure 50).

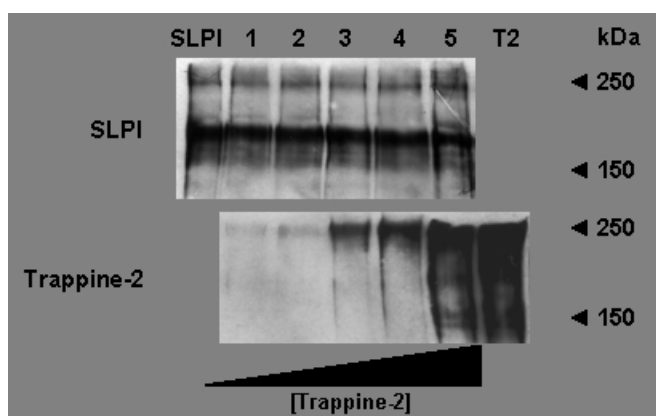


Figure 50 : Compétition entre la trappine-2 et le SLPI pour la fixation sur la fibronectine sous l'action du FXIIIa. Les complexes ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE 10% et détectés avec des anticorps anti-SLPI et anti-T2 après transfert. La concentration de SLPI est fixe ($3 \cdot 10^{-6}$ M) et la concentration de T2 est croissante : piste 1 : $3 \cdot 10^{-7}$ M, piste 2 : $6 \cdot 10^{-7}$ M, piste 3 : $1,2 \cdot 10^{-6}$ M, piste 4 : $3 \cdot 10^{-6}$ M et piste 5 : $7 \cdot 10^{-6}$ M (piste SLPI : $3 \cdot 10^{-6}$ M et piste T2 : $7 \cdot 10^{-6}$ M).

Nous avons observé que la fixation du SLPI sur la fibronectine par la TGase2 est inhibée en présence de DsC mais pas celle de la T2. Ces observations confirment les résultats obtenus sur les pistes 3 des figures 42 et 43. En effet, en présence de DsC, la formation des

complexes T2-T2 n'est pas inhibée alors que celle des complexes SLPI-SLPI l'est. De même, la présence de DsC n'influence pas la fixation du SLPI par le FXIIIa sur la fibronectine alors que la fixation de la T2 par le FXIIIa sur cette même protéine est totalement inhibée. Ces observations confirment les résultats obtenus sur les pistes 3 des figures 48, B et 49. En effet, la formation des complexes T2-T2, en présence de FXIIIa, est totalement inhibée par l'ajout de DsC alors que celle des complexes SLPI-SLPI n'est que partiellement inhibée par cette même addition.

Ces résultats distincts confirment la différence de spécificité de substrat entre les deux transglutaminases, la TGase2 et le FXIIIa et suggèrent que, pour la T2 et le SLPI, les résidus impliqués dans les réactions de transglutamination vont varier selon la transglutaminase testée. L'identification des résidus impliqués dans la réaction de transglutamination pour l'élafine, la T2 et le SLPI avec le FXIIIa est en cours.

F. Propriétés inhibitrices du SLPI lié par transglutamination

Comme pour la T2 et les inhibiteurs polyvalents (Publication n°2), nous avons testé si le SLPI reste inhibiteur de l'HNE lorsqu'il est fixé à la fibronectine et à l'élastine en présence de TGase2 (Figure 51).

En présence de cette transglutaminase, le SLPI est capable de se fixer sur la fibronectine (Figure 51, A) et sur l'élastine (Figure 51, B) et reste inhibiteur d'HNE. Lorsque le SLPI est fixé à la fibronectine, on observe une inhibition totale de l'HNE. En revanche, seulement 50% de l'activité HNE est inhibée lorsque le SLPI est fixé à l'élastine. Ces résultats suggèrent que, comme pour la T2, la fibronectine semble être un meilleur substrat de transglutamination pour la TGase2. En parallèle, nous avons comparé les propriétés inhibitrices du SLPI, vis-à-vis de l'HNE, avec celles du CemAQSLPI₂, du SLPI₂, de l'élafine et de la T2, fixés sur la fibronectine et l'élastine par la TGase2. En ce qui concerne la fixation à la fibronectine, on observe une inhibition pratiquement totale de l'HNE avec les différents inhibiteurs liés, sauf pour le SLPI₂ où l'inhibition n'est que de 40% environ. Ces résultats suggèrent que le domaine 2 du SLPI est un moins bon substrat pour la TGase2 que le domaine élafine. De plus, le domaine 1 du SLPI contiendrait également des résidus impliqués dans cette réaction de transglutamination.

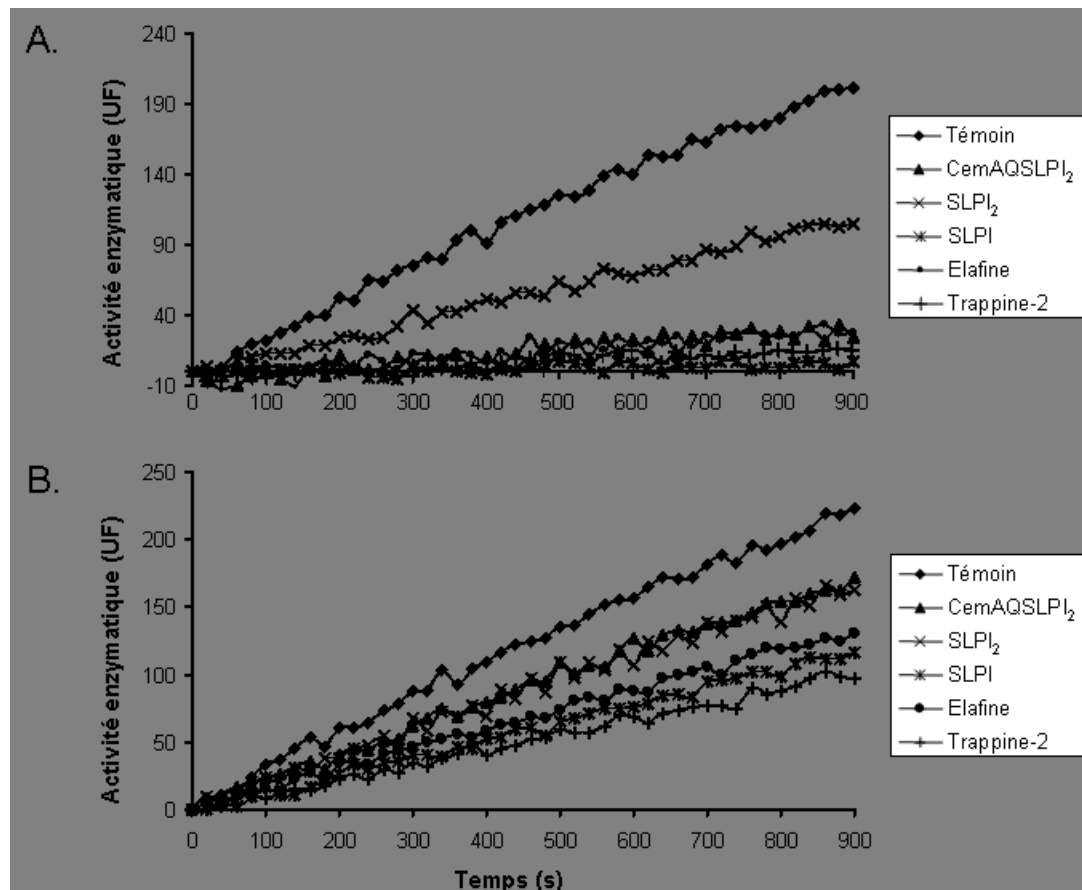


Figure 51 : Inhibition de l'HNE par le CemSLPI₂, le CemAQLSLPI₂, le SLPI₂, le SLPI, l'élafine et la trappine-2 liés à la fibronectine (A) et à l'élastine (B) par la TGase2. Concentration des inhibiteurs : $4 \cdot 10^{-6}$ M, HNE : 10^{-9} M, substrat Abz-APEEIMRRQ-EDDnp : 10 μ M. L'HNE a été incubée pendant 15 minutes avec les inhibiteurs. UF : unités de fluorescence.

L'élastine semble être un moins substrat de transglutaminase par rapport à la fibronectine. D'autre part, le SLPI₂ se fixe moins bien que le SLPI à la fibronectine, ce qui suggère que le domaine 1 du SLPI présente des résidus impliqués dans la réaction. Le domaine cémentoïne semble être peu impliqué dans la fixation à l'élastine car il n'y a pas de différence d'activité inhibitrice entre le SLPI₂ et le CemAQLSLPI₂ et très peu de différence également entre l'élafine et la T2. Ces différents résultats suggèrent que le SLPI se fixe aussi bien sur la fibronectine et l'élastine que la T2 en présence de TGase2. Nous montrons ici, pour la première fois, que le SLPI peut s'associer aux protéines de la matrice extracellulaire par transglutamination tout en restant inhibiteur d'HNE, comme l'élafine et la T2. Les mêmes expériences avec la CatG sont actuellement en cours.

Nous avons également montré que le CemSLPI₂ et le CemAQLSLPI₂, comme la T2, pouvaient se lier *in vitro* à la fibronectine sous l'action du FXIIIa (Figure 52). Des expériences similaires sont en cours pour déterminer si le SLPI fixé par le FXIIIa sur la

fibronectine et l'élastine est capable d'inhiber l'HNE et la CatG. La comparaison de l'activité inhibitrice du SLPI, du SLPI₂ et du CemAQLSLPI₂, vis-à-vis de l'HNE et de la CatG, permettra de préciser le rôle du domaine 1 du SLPI dans la réaction de transglutamination catalysée par le FXIIIa.

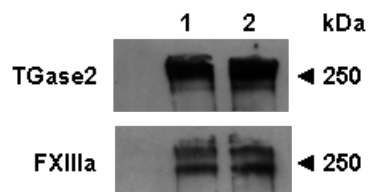


Figure 52 : Fixation de CemSLPI₂ (1) et CemAQLSLPI₂ (2) sur la fibronectine par la TGase2 et le FXIIIa. Les complexes ont été séparés par électrophorèse SDS-PAGE 10% et détectés avec des anticorps anti-SLPI après transfert.

IV. Conclusions et perspectives

Dans cette étude, nous avons caractérisé les propriétés de transglutamination de l'élafine, de la T2 et du SLPI *in vitro*. En ce qui concerne l'élafine et la T2, les propriétés de transglutamination ont déjà été décrites dans la littérature. L'utilisation de DsC et de peptides spécifiques de transglutamination ainsi que l'analyse par LC/MS des produits de réaction, nous a permis, dans un premier temps, d'estimer le nombre de Gln et de Lys de chaque inhibiteur impliquées dans cette réaction. Pour l'élafine, nous avons trouvé que ses deux Gln sont impliquées dans cette réaction de transglutamination. De même deux Lys, sur les 4 semblent être également impliquées.

Pour la T2, nous avons montré que 6 Gln semblaient être impliquées dans la réaction de transglutamination. Cet inhibiteur possède 6 Gln et 11 Lys. A ce jour, seules 3 Gln ont été décrites comme intervenant dans la réaction de transglutamination *in vivo* avec des protéines de l'épiderme comme la filagrine, la loricrine et l'involucrine (Steinert et Marekov, 1995). L'analyse en LC/MS des fragments obtenus par hydrolyse trypsique de complexe T2/fibronectine va nous permettre d'identifier les résidus importants, impliqués dans la réaction de transglutamination. Les lysines qui ne sont pas impliquées et qui peuvent être sensibles à la protéolyse, pourront être mutées, en particulier dans le domaine cémentoïne, de façon à limiter la dégradation des inhibiteurs par des protéases endogènes ou par des protéases libérées par des microorganismes.

Le SLPI est plus cationique que la T2. Il possède 5 Gln et 13 Lys mais ne présente pas de séquence consensus substrat de transglutaminase. Nous avons testé dans les mêmes conditions que pour l'élafine et la T2, les propriétés de transglutamination du SLPI avec du

DsC et les différents peptides. Nous avons montré dans un premier temps que le SLPI peut être substrat de transglutaminase. Les analyses en LC/MS ont permis de montrer que 3 Gln et que deux voire trois Lys sont impliquées dans cette réaction. L'analyse de l'hydrolyse trypsique de ces conjugués va nous permettre de d'identifier les résidus, impliqués dans la réaction de transglutamination.

Nous avons montré que la T2 et le SLPI sont substrats de la TGase2. C'est pourquoi nous avons testé la compétition de ces deux inhibiteurs pour se fixer sur la fibronectine et l'élastine sous l'action de cette enzyme. Nous avons observé qu'il n'y a pas de compétition entre ces deux inhibiteurs, ils ne semblent pas se fixer au niveau des mêmes sites sur la fibronectine.

Nous avons par ailleurs testé l'efficacité de transglutamination de l'élafine, de la T2 et du SLPI par le FXIIIa. Les inhibiteurs sont substrats de cette transglutaminase. De plus, il semble que le domaine cémentoïne de la T2 joue un rôle important dans cette réaction en comparaison avec l'élafine. Les réactions en présence de DsC et de peptides sont en cours d'analyse. Nous avons testé la compétition entre le SLPI et la T2 pour leur fixation à la fibronectine sous l'action de cette transglutaminase. Comme avec la TGase2, il n'y a pas de compétition entre ces deux inhibiteurs pour la fixation sur la fibronectine.

Nous avons testé les capacités inhibitrices du SLPI, fixé sur les protéines de la matrice extracellulaire, vis-à-vis de l'HNE. Comme pour la T2, le SLPI fixé reste inhibiteur de l'HNE. Le SLPI semble mieux se fixer que le SLPI₂ ce qui signifie que le domaine 1 doit être important dans les propriétés de transglutamination.

Les propriétés de transglutamination de la T2 et de la T2 A62L sous l'action du FXIIIa, décrites dans cette étude, pourraient rendre l'utilisation de ces inhibiteurs intéressante dans le cadre de thromboses de façon à limiter la libération de thrombus. En effet, les NSPs, en particulier l'HNE, sont impliquées dans des pathologies inflammatoires vasculaires impliquant le recrutement massif de neutrophiles comme dans l'athérosclérose. Les protéases sont responsables de la déstabilisation de la plaque d'athérome pouvant ainsi libérer le thrombus dans la circulation sanguine. La surexpression de l'élafine dans des modèles de souris atteintes de pathologies artérielles semble diminuer l'activité de l'HNE et l'inflammation due au recrutement des neutrophiles (Henriksen et Sallenave, 2008). La liaison d'un inhibiteur polyvalent, ciblant les trois NSPs, par transglutamination sur des protéines de cette zone pourrait avoir un effet protecteur vis-à-vis des NSPs.

PUBLICATION N°3

Article de revue sur les inhibiteurs des protéases à sérine de neutrophiles de la famille des chélonianines

Moreau Thierry, Baranger Kévin, Dadé Sébastien, Dallet-Choisy Sandrine, Guyot Nicolas et Zani Marie-Louise.

Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family.

Biochimie 90 (2008), 284-295.

The antibacterial and antifungal properties of trappin-2 (pre-elafin) do not depend on its protease inhibitory function

Kévin Baranger, Marie-Louise Zani, Jacques Chandenier, Sandrine Dallet-Choisy and Thierry Moreau

INSERM U618, Université François Rabelais, Tours, France

Keywords

antifungal activity; antimicrobial activity; serine protease inhibitors; trappin-2; WAP protein

Correspondence

T. Moreau, INSERM U618 Protéases et Vectorisation Pulmonaires, IFR 135, Imagerie Fonctionnelle, University François Rabelais, 10 Boulevard Tonnellé, 37032 Tours, Cedex, France
Fax: +33 247 366 046
Tel: +33 2 4736 6177
E-mail: thierry.moreau@univ-tours.fr

(Received 8 January 2008, revised 18 February 2008, accepted 22 February 2008)

doi:10.1111/j.1742-4658.2008.06355.x

Trappin-2 (also known as pre-elafin) is an endogenous inhibitor of neutrophil serine proteases and is involved in the control of excess proteolysis, especially in inflammatory events, along with the structurally related secretory leucocyte proteinase inhibitor. Secretory leucocyte proteinase inhibitor has been shown to have antibacterial and antifungal properties, whereas recent data indicate that trappin-2 has antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. In the present study, we tested the antibacterial properties of trappin-2 towards other respiratory pathogens. We found that trappin-2, at concentrations of 5–20 μ M, has significant activity against *Klebsiella pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Branhamella catarrhalis* and the pathogenic fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*, in addition to *P. aeruginosa* and *S. aureus*. A similar antimicrobial activity was observed with trappin-2 A62D/M63L, a trappin-2 variant that has lost its antiprotease properties, indicating that trappin-2 exerts its antibacterial effects through mechanisms independent from its intrinsic antiprotease capacity. Furthermore, the antibacterial and antifungal activities of trappin-2 were sensitive to NaCl and heparin, demonstrating that its mechanism of action is most probably dependent on its cationic nature. This enables trappin-2 to interact with the membranes of target organisms and disrupt them, as shown by our scanning electron microscopy analyses. Thus, trappin-2 not only provides an antiprotease shield, but also may play an important role in the innate defense of the human lungs and mucosae against pathogenic microorganisms.

Protease inhibitors of the chelonianin family, including secretory leucocyte proteinase inhibitor (SLPI), elafin and its active precursor trappin-2, are thought to be important in protecting the lungs against damage by the neutrophil serine proteases, human neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G [1]. SLPI and elafin/trappin-2 are structurally related in that both have a fold with a four-disulfide core, the whey acidic protein

(WAP) domain involved in protease inhibition [2,3]. Human SLPI is an unglycosylated, basic (pI $\sim$ 9.5) 11.7 kDa protein that is synthesized at many mucosal surfaces, including the lungs. It has a high affinity for elastase and cathepsin G and has two WAP domains, each of which is homologous to elafin. Elafin corresponds to the C-terminal inhibitory domain (57 residues) of trappin-2 (also called pre-elafin) which,

Abbreviations

AESBF, 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride; CFU, colony forming unit; MED, minimum effective dose; SEM, scanning electron microscopy; SLPI, secretory leucocyte proteinase inhibitor; WAP, whey acidic protein.

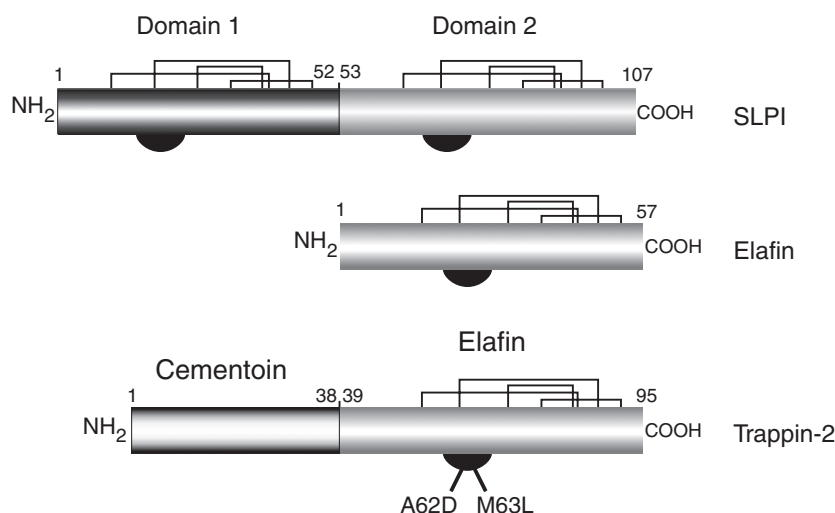


Fig. 1. Schematic structure of protease inhibitors of the chelonianin family showing the domain organization, disulfide bond topology (plain line) and the inhibitory loop (half black disk) of each WAP (protease inhibitor) domain. The mutations introduced in the A62D/M63L trappin-2 variant at the P1 and P1' positions (62 and 63, respectively) of the inhibitory loop are also indicated.

like SLPI, is a 95 residue long basic protein ($pI \sim 9.0$) (Fig. 1). It was first purified in 1990 as an elastase inhibitor by two groups: from the skin of patients with psoriasis [4,5] and from lung secretions [6]. *In vivo*, elafin is released from trappin-2 by proteolysis, possibly by mast cell tryptase, which cleaves the Lys-Ala peptide bond between the N-terminal cementoin domain and the C-terminal elafin domain very efficiently *in vitro* [7]. The 38 residue N-terminal domain of trappin-2 has a unique structural feature in that it contains several repeated motifs with the consensus sequence Gly-Gln-Asp-Pro-Val-Lys that can covalently link the whole trappin-2 to extracellular matrix proteins under the catalytic action of a tissue transglutaminase [8]. Trappin-2 cross-linked to fibronectin retains its capacity to inhibit its two target proteases: elastase and proteinase 3 [9].

SLPI and elafin/trappin-2 have many biological functions in addition to their role as inhibitors of neutrophil serine proteinases; their actions range from anti-inflammatory, to immunomodulatory, antibacterial, antifungal and antiviral functions [1]. SLPI and elafin/trappin-2 both have antimicrobial activity against Gram-negative and Gram-positive bacteria. SLPI is active against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* [10,11]. Its antibacterial activity against *S. aureus* and *E. coli* has been ascribed to its N-terminal domain because the two isolated domains, alone or in combination, are less active than the whole SLPI molecule [10]. As the N-terminal domain of SLPI most likely has no protease inhibitory activity, unlike the C-terminal domain [12], the antibacterial effect of SLPI may be independent of its antiprotease activity and perhaps related to its cationic nature. SLPI has a

well-characterized fungicidal activity against *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*, in addition to its antibacterial properties [13]. This has been attributed to its N-terminal domain and is comparable to that of human defensins and human lysozyme.

Elafin and trappin-2 are both antimicrobial against *S. aureus* and *P. aeruginosa* [14,15] but not against *E. coli* [14]. These previous studies found that trappin-2 was much more active than elafin. Similar to SLPI, the antibacterial activities of elafin/trappin-2 appear to be independent of their antiprotease activity, as assessed from experiments on *S. aureus* and *P. aeruginosa* using the isolated N-terminal trappin-2 (cementoin) and C-terminal (elafin) domains [15]. The lungs of mice overexpressing elafin after adenovirus-mediated gene transfer have dramatically increased the antibacterial protection against *S. aureus* and *P. aeruginosa* infection [16,17]. Hence, SLPI, elafin and its precursor trappin-2, which are all found in mucosal secretions, are believed to be part of the pulmonary innate defense system, together with a vast array of defense effector molecules, including the defensin and cathelicidin families of antimicrobial peptides. Many WAP-containing proteins that are not protease inhibitors, such as eppin [18], mouse SWAM1 and SWAM2 [19] and omwaprins from snake venom [20], also display antimicrobial activity.

Trappin-2 is an attractive candidate molecule for aerosol-based anti-inflammatory therapy, which targets neutrophil serine proteinases in lung diseases. Its antibacterial and antifungal properties may thus reinforce its therapeutic potential. Therefore, in the present study, we investigated the antibacterial and antifungal properties of trappin-2 towards microorganisms with a preferential tropism for lungs,

including the bacteria *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Branhamella catarrhalis* and the pathogenic fungi *A. fumigatus* and *C. albicans*. Our results indicate that trappin-2 has a broad antibacterial activity and is fungicidal for *A. fumigatus* and *C. albicans*. Using trappin-2 A62D/M63L, a variant that has been designed to suppress its protease inhibitory properties, we show that the antibacterial/fungicidal action of trappin-2 is independent of its antiprotease function. Although we have not determined its exact mechanism of action, we have shown that the antibacterial/fungicidal properties of trappin-2 involve the cationic nature of the molecule, as assessed from the salt and heparin dependence of the antimicrobial and antifungal effects.

Results

Antimicrobial effects of recombinant wild-type trappin-2 and trappin-2 A62D/M63L

We tested the antibacterial activity of trappin-2 against pathogenic bacteria associated with lung diseases: Gram-negative bacteria, such as *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *H. influenzae*, *B. catarrhalis*, and Gram-positive cocci, such as *S. aureus* and *S. pneumoniae*. Wild-type trappin-2 significantly decreased the number of surviving colony forming units (CFUs) of all bacteria tested in a dose-dependent manner, except for *K. pneumoniae* and *H. influenzae*, which were less sensitive at high doses than at low doses of approximately 5 μM (Figs 2 and 3). The minimum effective dose

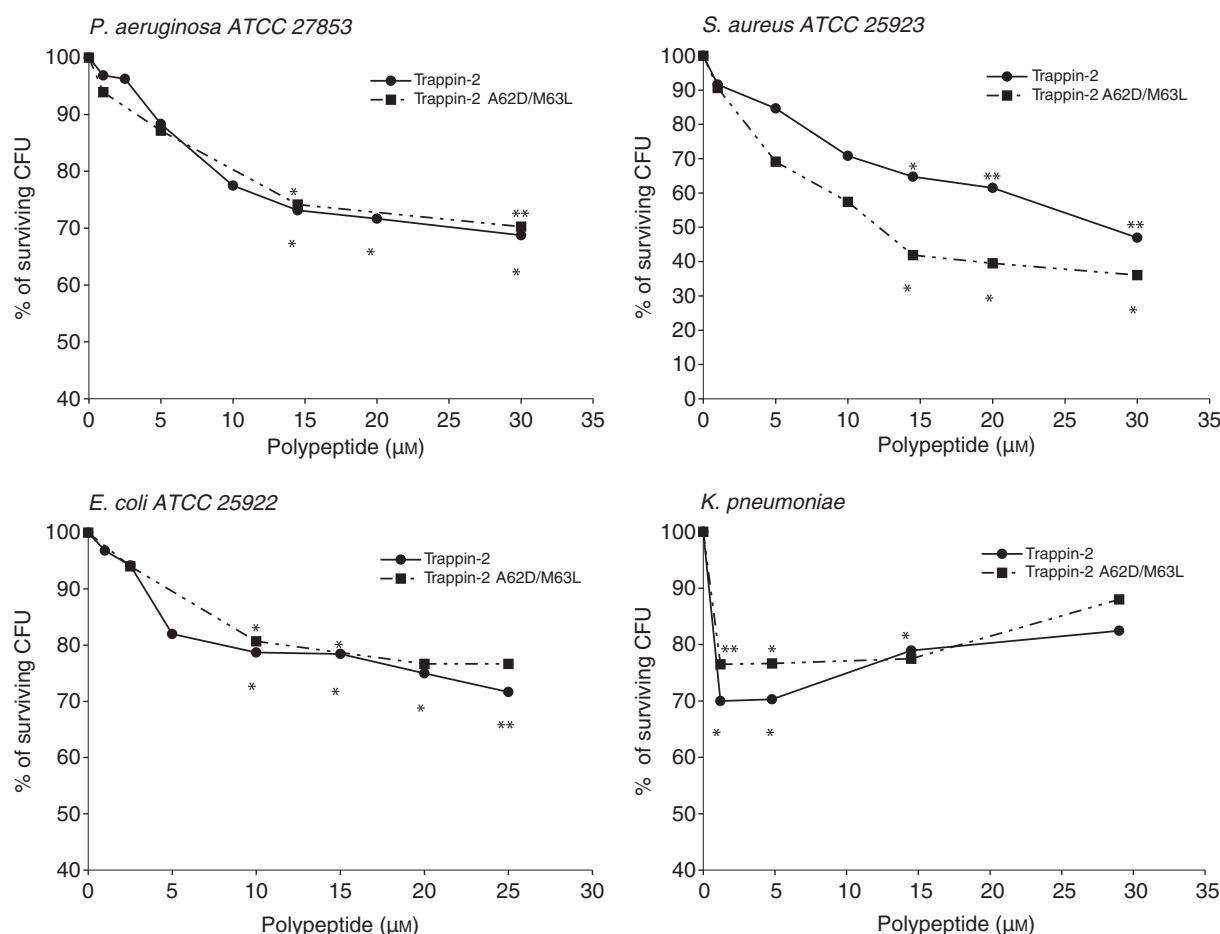


Fig. 2. Antibacterial activity of trappin-2 and trappin-2 A62D/M63L. Effect of different concentrations of recombinant wild-type trappin-2 (●) and trappin-2 A62D/M63L (■), a variant with attenuated antiprotease properties, on *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* and *K. pneumoniae*. Log-phase bacteria (5×10^3 CFU·mL⁻¹) were incubated for 3 h with the indicated concentrations of polypeptide at 37 °C and the number of CFU was determined by plating out serial dilutions on agar plates. The results are expressed as percentages of surviving CFU, where 100% is the number of CFU obtained without sample protein. The number of dead bacteria after 3 h of incubation in buffer alone (control) was $\leq 2\%$. Data are plotted as the median values obtained in five separate experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

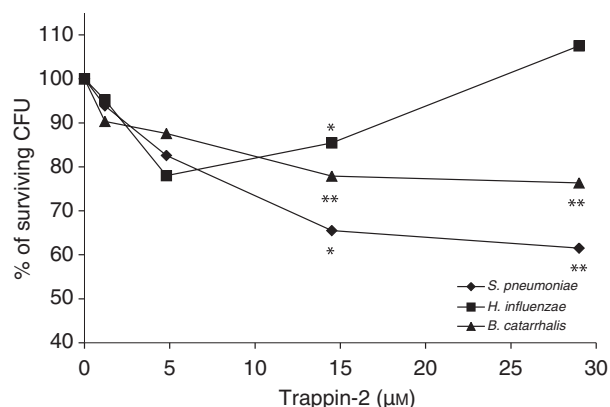


Fig. 3. Antibacterial activity of trappin-2 on *S. pneumoniae*, *B. catarrhalis* and *H. influenzae* clinical strains. The experiments were performed as described in Fig. 2. The number of dead bacteria after 3 h of incubation in buffer alone (control) was $\leq 2\%$ for *B. catarrhalis* and $\leq 5\%$ for *S. pneumoniae* and *H. influenzae*. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

(MED) of trappin-2 that significantly killed bacteria was $2 \mu\text{M}$ for *K. pneumoniae*, $10 \mu\text{M}$ for *E. coli* and $15 \mu\text{M}$ for all the other bacteria (Figs 2 and 3). The maximum effect was obtained with $15\text{--}30 \mu\text{M}$ for *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. catarrhalis* and $5 \mu\text{M}$ for *K. pneumoniae* and *H. influenzae*: approximately 30% fewer bacteria than in phosphate buffer alone. Surprisingly, the percentage of surviving *K. pneumoniae* and *H. influenzae* CFU increased as the trappin-2 concentration increased. As suggested previously, this may reflect the capacity of some bacteria to use proteins/peptides, in this case trappin-2, as a source of nitrogen [15], thereby competing with the antibacterial effect of trappin-2. However, none of the bacteria tested destroyed trappin-2 in the incubation mixtures, suggesting that another, as yet unidentified, mechanism is responsible for the observed insensitivity of *K. pneumoniae* and *H. influenzae* to high trappin-2 concentrations. Trappin-2 ($30 \mu\text{M}$) killed approximately 50% of *S. aureus* and 40% of *S. pneumoniae*.

To further explore the molecular basis for the antibacterial activity of trappin-2, we designed a trappin-2 variant, trappin-2 A62D/M63L, in which both P1 and P1' residues, two key residues involved in the protease inhibitory activity, were mutated to suppress its ability to inhibit neutrophil serine proteases (Fig. 1). Trappin-2 A62D/M63L did not inhibit proteinase 3 and was a poor inhibitor of neutrophil elastase, with a K_i approximately three orders of magnitude higher ($3.5 \times 10^{-8} \text{ M}$) than wild-type trappin-2 ($3 \times 10^{-11} \text{ M}$) [21]. Trappin-2 A62D/M63L, like wild-type trappin-2, did not inhibit cathepsin G. The dose-response curves obtained for this mutant with all the bacteria, except

B. catarrhalis, *S. pneumoniae* and *H. influenzae*, which were not tested, paralleled those obtained with wild-type trappin-2 (Fig. 2). The mutant appeared to be significantly more active against *S. aureus* than was wild-type trappin-2. Taken together, this suggests that the antimicrobial activity of trappin-2 is independent of its intrinsic inhibitory activity and that trappin-2 and its uninhibitory mutant are bactericidal because fewer surviving CFU were present after 3 h of incubation with either molecule than at the start of the incubation.

Antifungal activities of trappin-2 and trappin-2 A62D/M63L towards *A. fumigatus* and *C. albicans*

Both trappin-2 and trappin-2 A62D/M63L had dose-dependent fungicidal activity against both swollen *A. fumigatus* conidia and *C. albicans* pseudoconidia but were not active against dormant (i.e. metabolically inactive) *A. fumigatus* conidia. The MED was approximately $5 \mu\text{M}$ for swollen *A. fumigatus* conidia, whereas dormant conidia were not killed (Fig. 4). The maximum fungicidal effect was approximately 60% with the protein concentrations tested and was reached at a $15 \mu\text{M}$ concentration of trappin-2.

Figure 4 shows the dose-response curve for the fungicidal effect of trappin-2 towards *C. albicans* yeast cells. The fungicidal activity of trappin-2 was dose-dependent but the effects of both trappin-2 forms were less pronounced than for *A. fumigatus*. The MED after incubation for 3 h was approximately $15 \mu\text{M}$, with a maximum killing activity ($\sim 30\%$) at a $15\text{--}30 \mu\text{M}$ concentration of trappin-2. As with the bacteria, the uninhibitory mutant had the same antifungal activity as wild-type trappin-2. Elafin had a lower antifungal activity than trappin-2, on a molar basis (Fig. 4). The fungicidal effect of a $5 \mu\text{M}$ concentration of trappin-2 towards *C. albicans* was time-dependent, reaching 92% after 6 h and 98% after 18 h (Fig. 5).

Effect of NaCl and heparin on the antibacterial and antifungal activities of trappin-2

The antimicrobial and antifungal activities of trappin-2 are probably due to its cationic nature (net charge $+7$), which may enable it to destabilize the negatively charged cell membranes of microorganisms. Many antimicrobial peptides, including classical antimicrobial peptides such as LL-37 and the defensins, have the ability to bind heparin, whereas many heparin-binding peptides display antimicrobial activity. This prompted us to investigate the heparin-binding properties of trappin-2 by heparin-Sepharose affinity chromatogra-

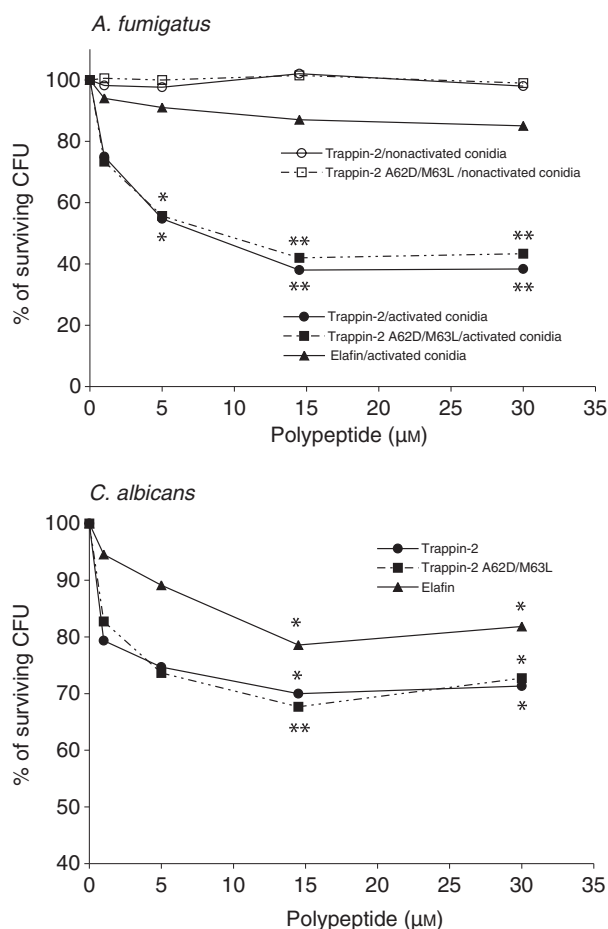


Fig. 4. Antifungal activity of trappin-2 and trappin-2 A62D/M63L on *A. fumigatus* and *C. albicans*. Upper panel: mid-log phase swollen activated conidia of *A. fumigatus* (5×10^3 cells·mL⁻¹) were exposed to trappin-2 (●), trappin-2 A62D/M63L (■) or elafin (▲) for 3 h at 37 °C. The dormant (metabolically quiescent) conidia were also exposed to trappin-2 (○) and trappin-2 A62D/M63L (□) in the same conditions. Lower panel: *C. albicans* pseudoconidia (5×10^3 CFU·mL⁻¹) were incubated with the indicated concentrations of trappin-2 (●), trappin-2 A62D/M63L (■) or elafin (▲). The numbers of surviving CFU of both fungi were determined by plating out yeast cells on Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol-2-agar plates. The number of dead cells after 3 h of incubation in buffer alone (control) was $\leq 2\%$. Data are plotted as the median values obtained in five separate experiments * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

phy, despite the absence of obvious consensus motifs for heparin binding. Trappin-2 was eluted from heparin-Sepharose (Fig. 6) at a higher ionic strength (0.3–1 M NaCl) than elafin (0.15–0.3 M NaCl). Adding heparin to the trappin-2 solution before chromatography specifically abolished this interaction (data not shown). Thus, heparin is specifically bound to trappin-2 or elafin, probably via electrostatic interactions. We then examined the effect of heparin on the antimicrobial

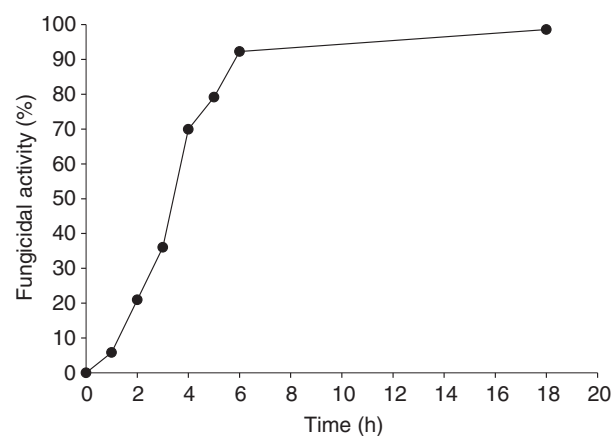


Fig. 5. Kinetics of fungicidal activity of trappin-2. *C. albicans* cells were exposed to 5 μ M trappin-2 for 0–18 h. The fungicidal activity was evaluated by determining the numbers of surviving CFU after plating out yeast cells on Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol-2-agar plates and expressed as a percentage of the control (no trappin-2). Results show the data obtained in one experiment.

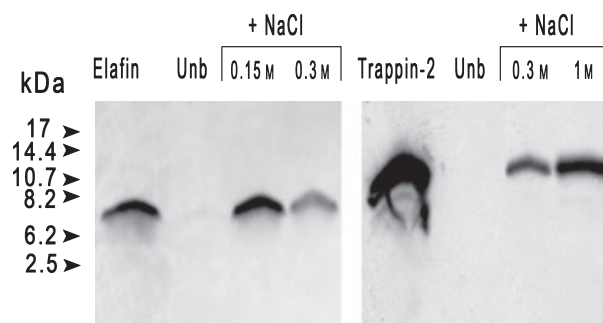


Fig. 6. Western blot analysis of elafin and trappin-2 fractionated on heparin-Sepharose. The heparin-binding capacities of elafin and trappin-2 were evaluated by affinity chromatography using heparin-Sepharose. Elafin or trappin-2 (15 μ g) was loaded onto a heparin-Sepharose column equilibrated with 25 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). The column was washed with the equilibrium buffer and heparin-bound fractions were eluted with 0.15, 0.3 and 1 M NaCl. Aliquots corresponding to unbound fractions (Unb) or elutions with 0.15, 0.3 and 1 M NaCl were loaded on a high-resolution SDS/PAGE gel and analyzed by western blotting using polyclonal anti-trappin-2 sera. The molecular masses of the protein standards are shown on the left.

and antifungal activities of trappin-2 using *S. aureus* and *C. albicans*. Heparin, at a heparin : trappin-2 ratio of 10, significantly decreased, but did not abolish, the antibacterial and antifungal activities of trappin-2 (Fig. 7). These antifungal and antibacterial activities were almost completely blocked by 0.3 M NaCl (Fig. 7). There is thus clear evidence that the cationic character of trappin-2 is involved in its antibacterial and antifungal activities.

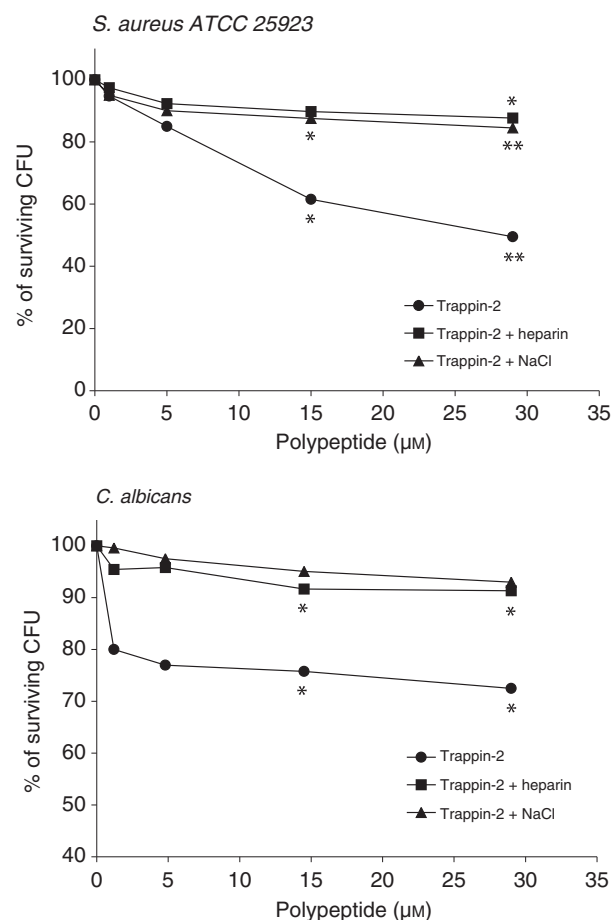
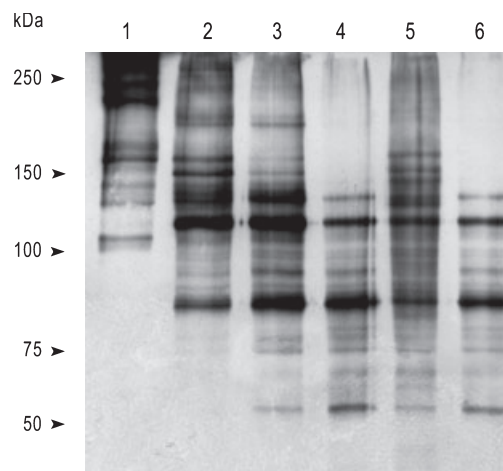


Fig. 7. Effect of NaCl and heparin on the antibacterial/antifungal action of trappin-2 towards *S. aureus* and *C. albicans*. Both microorganisms were incubated with the indicated concentrations of trappin-2 in the absence (●) or presence of NaCl (0.3 M final) (▲) or low-molecular weight heparin at a ratio heparin/trappin-2 = 10 (■). The number of surviving CFU were evaluated as described in Figs 1 and 3. Data are plotted as median values ($n = 4$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Effect of trappin-2 on the proteolytic activities of *A. fumigatus*

The mechanisms by which *A. fumigatus* colonizes the lungs is not yet clear but is thought to depend on secreted proteases, which are therefore considered to be essential virulence factors [22]. Lung tissue injury is a known risk for the development of invasive aspergillosis because *A. fumigatus*, or other pathogens, have greater access to fibronectin and other extracellular matrix proteins. We investigated the effects of trappin-2 on the degradation of fibronectin by *A. fumigatus* culture supernatants because it is primarily a protease inhibitor. Fibronectin was broken down by *A. fumigatus* protease(s) in a dose-dependent manner (Fig. 8).



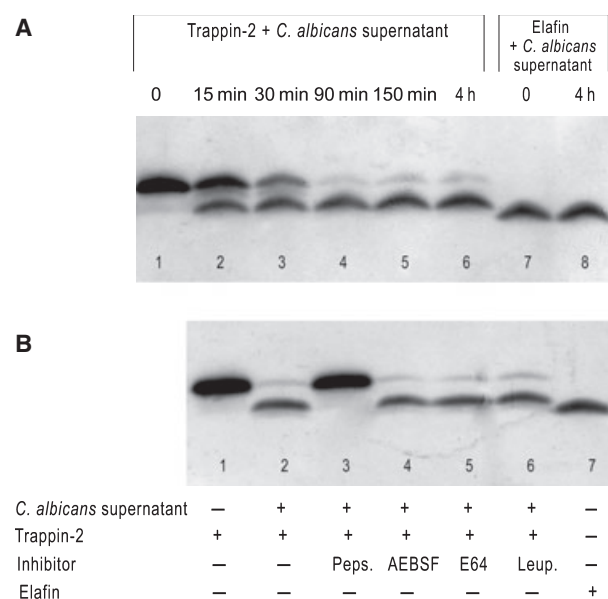
<i>A. fum.</i> supernatant	0 μL	5 μL	10 μL	15 μL	15 μL	15 μL
Trappin-2	—	—	—	—	+	—
Trappin-2 A62D/M63L	—	—	—	—	—	+

Fig. 8. Degradation of fibronectin by *A. fumigatus* protease(s). Human fibronectin (control, lane 1) was incubated with increasing volumes (lanes 2–4) of *A. fumigatus* culture supernatant for 90 min at 37 °C in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) (20 μL final volume). Trappin-2 (lane 5) or trappin-2 A62D/M63L (lane 6) was added in the incubation mixture (10^{-7} M final) to evaluate their effect on fibronectin degradation by *A. fumigatus* protease(s). Fibronectin breakdown products were separated on a 10% SDS/PAGE gel and immunoblotted using anti-fibronectin sera. Standard proteins with known molecular masses are shown on the left.

Fibronectin degradation, however, was significantly reduced when wild-type trappin-2 (10^{-7} M) was added to the *A. fumigatus* supernatant, whereas the uninhibitory derivative trappin-2 A62D/M63L had no effect. Thus, one or more fungal proteases are inhibited by trappin-2. However, there was no apparent proteolytic destruction of trappin-2 or elafin by *A. fumigatus* protease(s) (data not shown).

Trappin-2 degradation by *C. albicans* culture supernatant

C. albicans secretes many proteases, mostly aspartic [23] and serine [24] proteases, which are thought to be essential for *C. albicans* virulence. Since many host defense molecules, such as lactoferrin, immunoglobulins and the protease inhibitors α_2 -macroglobulin and cystatin A, are efficiently cleaved by the aspartyl proteases secreted by *C. albicans* [23], we analyzed the effect of a *C. albicans* culture supernatant on trappin-2 and elafin. Elafin was not broken down by *C. albicans* protease(s), but trappin-2 was rapidly processed to a molecular form with a slightly higher molecular mass than elafin by SDS/PAGE (Fig. 9). Our previous observations on



the proteolytic susceptibility of trappin-2 [7] suggest that trappin-2 was cleaved, in its N-terminal cementoin domain, a few residues upstream of the compact proteolysis-resistant elafin domain. This cleavage was blocked by pepstatin, an inhibitor of aspartic proteases, but not by 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), which inhibits serine proteases, or E64, which inhibits cysteine proteases, and not by leupeptin, which inhibits both classes of proteases. Although our assays were performed at neutral pH, trappin-2 was probably cleaved by one of the numerous *C. albicans* secreted aspartyl proteases, which are active in the range pH 2.0–7.0. Trappin-2 did not inhibit fibronectin degradation by *C. albicans* proteases, which is essentially performed by acid proteases (data not shown).

Scanning electron microscopy (SEM) analysis of morphological changes in bacteria induced by trappin-2

Because cationic antibacterial peptides interact with target organism membranes, we examined the morphological changes in *S. aureus*, *P. aeruginosa* and

C. albicans cells induced by trappin-2 by SEM. Control bacterial cells had a smooth and normal surface morphology, whereas bacterial cells incubated with 5 μ M trappin-2 for 3 h showed severe membrane damage, including wrinkling, crumpling and surface blebbing (Fig. 10). SEM revealed pore-like structures at the membrane surface, especially in *P. aeruginosa* cells (Fig. 10E,F), which probably leads to leakage of the cytoplasmic content of damaged bacterial or fungal cells.

Discussion

The main physiological function attributed to elafin and/or trappin-2 and its precursor is the protection of tissues against excessive proteolysis by serine proteinases that are released from neutrophils at inflammatory sites, particularly elastase and proteinase 3, their two cognate enzymes. The fact that elafin and trappin-2 are found at many mucosal surfaces, especially in the skin and in the lung, and are low molecular weight cationic molecules structurally related to SLPI, prompted Simpson *et al.* [15] to investigate the antibacterial activity of these molecules. Trappin-2 (also called full-length elafin or pre-elafin) and elafin were found to have bactericidal properties towards *P. aeruginosa* and *S. aureus*, two frequent lung pathogens. Meyer-Hoffert *et al.* [14] later observed that elafin inhibited the growth of *P. aeruginosa* but could not confirm its bactericidal activity, despite testing three different strains of *P. aeruginosa*.

We have investigated the effects of trappin-2 and elafin on other pathogens that are commonly found in or associated with lung diseases: Gram-negative and Gram-positive bacteria and fungi. Because the data obtained with respect to the antimicrobial effects of elafin and/or trappin-2 on *P. aeruginosa* were somewhat discrepant [14,15], we included the two species that were first reported to be efficiently killed by elafin: *P. aeruginosa* and *S. aureus* [15]. The observed discrepancy for *P. aeruginosa* has been attributed to the fact that the two studies were performed on different strains. We used the *P. aeruginosa* ATCC 27853 strain and found that a maximum killing of approximately 30% was obtained with the highest trappin-2 concentrations used (15–30 μ M). This result is clearly different from those obtained with the previously used strains [14,15] and may reflect differences in strain sensitivity and experimental methods. All the other bacteria tested in the present study, including *S. aureus*, were sensitive to trappin-2 (20–60% killing) in a dose-dependent manner, so that maximal activity was obtained at the highest concentration (30 μ M). Similar

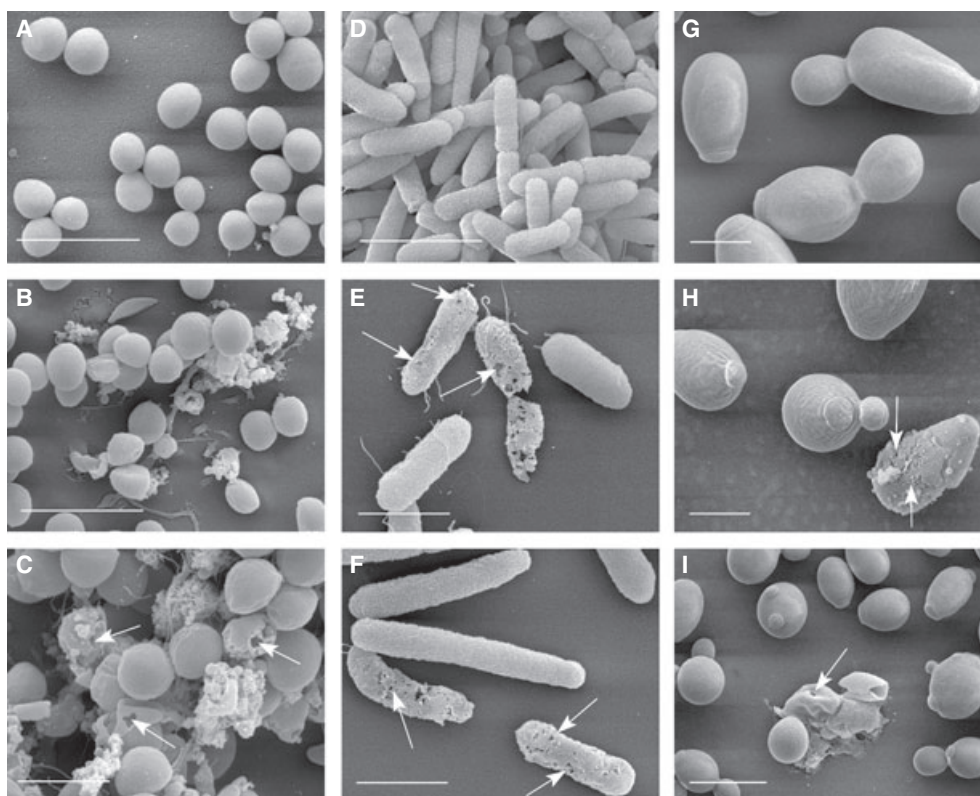


Fig. 10. SEM analysis of the effect of trappin-2 on bacterial cells. Representative micrographs of *S. aureus* (A–C), *P. aeruginosa* (D–F) and *C. albicans* (G–I) incubated for 3 h without (A, D, G) or with trappin-2 (5 μ M). Original magnification, $\times 5000$ (I), $\times 20\,000$ (A, B, D, G, H) or $\times 30\,000$ (C, E, F). The horizontal white bar corresponds to 5 μ m (I), 2 μ m (A, B, D, G, H) or 1 μ m (C, E, F). Pore-like structures at the membrane surface are indicated by white arrows.

to Simpson *et al.* [15], we found that elafin has far less antibacterial activity than trappin-2 (data not shown). A trappin-2 variant that did not inhibit neutrophil serine proteases was as effective, or even more effective on *S. aureus*, than was wild-type trappin-2. This suggests that the antimicrobial activity of trappin-2 is independent of its intrinsic antipeptidase function, although it is always possible that trappin-2 can also inhibit as yet unidentified bacterial serine protease(s). Indeed, recent data indicate that trappin-2 inhibits arginyl peptidase (also known as protease IV), a serine protease that is secreted by some strains of *P. aeruginosa* [25]. It is assumed that, at low concentrations, trappin-2 inhibits arginyl peptidase and thereby inhibits the growth of *P. aeruginosa* on complex medium by preventing the release of nutrients from protein substrates by this enzyme. However, as the *P. aeruginosa* strain (ATCC 27853) that we used has no arginyl peptidase activity, the inhibition of bacterial protease(s) is not relevant to our findings. Our results are in agreement with those of previous studies using isolated discrete domains of trappin-2, cementoin and elafin,

which revealed that the antimicrobial activity is independent of the anti-elastase activity because the cementoin domain alone was active [15]. The antimicrobial activity of trappin-2 probably involves its interaction(s) with the bacterial membranes as a result of the cationic nature of the molecule, which is a property shared by most of antimicrobial peptides [26]. Our SEM analyses indicate that trappin-2 interferes with the membrane integrity of bacterial/fungal cells, causing structural changes such as membrane wrinkling and the formation of ion-permeable channels that probably increase membrane permeability and finally lead to cell lysis. We have no evidence available, as yet, to confirm whether trappin-2, which can bind lipopolysaccharides [27], binds to bacterial membrane lipopolysaccharides or directly to the membrane, as proposed for the N-terminal part (residues 1–15) of elafin [28]. Our finding that increasing the NaCl concentration to 0.3 M dramatically inhibited the antibacterial activity of trappin-2 comprises additional evidence demonstrating that the cationic properties of trappin-2 are important for its antibacterial activity.

Furthermore, the antibacterial activity of trappin-2, which we show to be a heparin-binding protein, was abolished in the presence of heparin. This implies that the antibacterial activity of trappin-2 is charge-dependent and that trappin-2 probably interacts with the anionic cell membrane of bacteria. The antibacterial activity of SLPI (net charge +12), which is even more cationic than trappin-2 (+7) or elafin (+3) and also binds heparin, is blocked in the presence of 0.15 M NaCl [10]. The differences in the distribution of positive charges on the surfaces of elafin and SLPI molecules [1] may well be responsible for their different sensitivities to the ionic environment, and could explain their different antibacterial selectivities. Whether SLPI and trappin-2 act synergistically together or with other antimicrobial peptides has not yet been investigated, but this could well be the case because SLPI acts synergistically and/or additively with other antimicrobial factors [29]. Our results indicate that trappin-2 has a broad spectrum but rather modest antibacterial activity compared to true antibacterial peptides such as lysozyme, defensins or the cathelicidin LL-37, although trappin-2 is active at concentrations (5–20 μ M) similar to those in the tissues where it is produced [1]. The antibacterial and antifungal activities of trappin-2 and SLPI are similar in terms of dose- and time-dependence [10,11], although SLPI appeared to be more sensitive to NaCl. These data are in favour of the idea that trappin-2 (and a fortiori elafin) and SLPI probably provide antimicrobial support to the more powerful epithelial antibiotic peptides found at mucosal surfaces. In addition to its antibacterial activity *per se*, trappin-2 may also help regulate LL-37 activity because it is a potent inhibitor of neutrophil proteinase 3, which is the main serine protease responsible for the extracellular cleavage of hCAP-18 to specifically generate LL-37 [30]. This might be important in inflammatory lung diseases such as cystic fibrosis where the proteinase 3 concentration is higher than that of neutrophil elastase [31].

Trappin-2 has dose-dependent antifungal properties towards *A. fumigatus* and *C. albicans*, in addition to its bactericidal activity. Although this is the first demonstration of its antifungal activity, our finding is not surprising because SLPI also has fungicidal or fungistatic properties [13]. Furthermore, trappin-2 also inhibits the protease(s) produced by *A. fumigatus*. This may be biologically relevant because inhibition of the proteases secreted by *A. fumigatus* conidia during germination in lung tissues may severely limit the colonization of the lung matrix by *A. fumigatus*. Trappin-2, which has antifungal properties towards *C. albicans*, also has anti-HIV-1 activity [32]. The fact that oral

candidiasis is the most common mucosal manifestation associated with HIV infection [33], and that there are significant concentrations of trappin-2/elafin in the saliva [34], emphasizes the role of trappin-2 in protecting mucosae from invading pathogens.

Although we do not know whether SLPI inhibits the proteases secreted by *A. fumigatus*, producing molecules with both antibacterial/antifungal and antipeptidase properties such as trappin-2 and SLPI could be a host strategy to efficiently fight bacterial/fungal infections. However, most pathogens have evolved strategies designed to interfere with the activity of host defense molecules [35]. Perhaps trappin-2, like other defense molecules, is a target for *C. albicans* aspartyl protease(s), which cleave(s) within the cementin domain to release an elafin-like peptide that appears to be far less antifungal than trappin-2, possibly because it is less cationic than trappin-2. In addition, neutrophil elastase is inhibited by the *Aspergillus flavus* elastase inhibitor AFLEI [36]. Thus, these data suggest that neutrophil proteases and their specific inhibitors (SLPI and elafin/trappin-2) are part of the molecular toolbox used to fight bacterial and fungal infections in the human lung.

In summary, we demonstrate that trappin-2, and to a lesser extent elafin, have broad antibacterial and antifungal properties that are independent of their antipeptidase function and probably limited to conditions of low ionic strength. As trappin-2 is a promising antipeptidase agent for use in an aerosol-based treatment of inflammatory lung diseases such as chronic obstructive pulmonary disease, where *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* and *B. catarrhalis* are prevalent bacteria in acute exacerbations [37], its antibacterial and antifungal properties considerably reinforce its therapeutic potential.

Experimental procedures

Material

Sabouraud medium was obtained from Oxoid (Dardilly, France). Sabouraud gentamicin chloramphenicol-2-agar plates, Trypcase Soy agar + 5% Sheep blood plates, Chocolate agar + PolyViteX® were obtained from Biomérieux (Lyon, France). Brain–heart infusion and tryptic soy broth were purchased from Fluka (St Quentin Fallavier, France). Gentamicin sulfate and low-molecular weight heparin were obtained from Sigma (St Quentin Fallavier, France). Red blood cell extract was from Biorad (Marnes-la-Coquette, France). Heparin-Sepharose CL-6B was purchased from GE HealthCare Europe (Orsay, France). All other reagents were of analytical grade.

Microorganisms

Bacterial strains *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853 and clinical strains of *K. pneumoniae*, *B. catarrhalis*, *S. pneumoniae* and *H. influenzae* were kindly provided by A. Rosenau (Department of Microbiology, University of Tours, France). *C. albicans* was originally isolated from the blood of a patient with a urinary infection and *A. fumigatus* was originally obtained from a neutropenic patient with pulmonary aspergillosis. Both fungal strains were a gift of J. Chandenier (Department of Parasitology, University of Tours). Antimicrobial assays were performed in 10 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4), 0.15 M NaCl (referred to as phosphate buffer).

Recombinant proteins

Elafin and trappin-2 were produced as tag-free recombinant proteins in the laboratory as previously described [21]. Trappin-2 A62D/M63L, an inhibitory loop mutant designed to suppress the inhibitory capacity of trappin-2, was generated using the trappin-2 cDNA cloned into pGE-SKA-B/K (20 ng) as a template and the oligonucleotides T1 (5'-CGACTCGAGAAAAGAGCTGTCACGGGAGTTCCT-3'), T2 (5'-CGAGCGGCCGCCCCCTCTCACTGGGGAAC-3'), T3 (5'-CCGGTGC GACTTGTGAATCCC-3') and T4 (5'-GGGATTCAACAAGTCGCACCGG-3'). PCR amplification was performed according to Higuchi *et al.* [38] to obtain the cDNA encoding A62D/M63L. Oligonucleotides T3 and T4 were used to introduce the Ala/Asp mutation (Asp codon: GAC) and Met/Leu substitution (Leu codon: TTG). The full-length cDNA was cloned into the pPIC9 vector and electroporated into *Pichia pastoris* yeast strain GS115 (his4) competent cells (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The A62D/M63L trappin-2 mutant was then expressed and purified by cation exchange chromatography, as described previously for wild-type elafin and trappin-2 [21]. The purified molecule migrated as a single band at 12 kDa in nonreducing SDS/PAGE gel, indicating the homogeneity of the preparation.

Antibacterial assays

The antibacterial activity of the proteins was investigated using log-phase bacteria first grown on Columbia agar. Bacteria in the mid-logarithmic phase were obtained by adding 1 mL of an overnight culture in tryptic soy broth (*E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *B. catarrhalis*) to 9 mL of tryptic soy broth, which was then incubated for 3 h at 37 °C under constant agitation. The bacteria were then washed twice in phosphate buffer and their concentration estimated at A_{595} . The proteins were diluted in a final volume of 90 μ L of phosphate buffer, added to 100 μ L of phosphate buffer containing 5×10^3

mid-log growth phase bacteria mL^{-1} and the mixture was incubated for 3 h at 37 °C. The number of CFU was determined by plating bacteria on Columbia agar. *Streptococcus pneumoniae* was grown and plated out on tryptic soy agar + 5% sheep blood plates and *H. influenzae* was grown on chocolate agar + PolyViteX® at 37 °C in an atmosphere containing 5% CO₂. Bacteria were cultured in brain–heart infusion with 5% red blood cell extract with the various tested proteins and the CFU counted. The percentage of surviving CFU was calculated by the formula $N/N_{\text{control}} \times 100$, where N and N_{control} were the numbers of CFU obtained after 3 h of incubation with and without the tested protein (five experiments). The number of dead bacteria after 3 h of incubation in buffer alone (control) was $\leq 2\%$ for all bacteria tested, except for *S. pneumoniae* and *H. influenzae* ($\leq 5\%$).

Antifungal tests

The antifungal activity of the proteins against *C. albicans* was investigated using logarithmic-phase cells as described for bacterial strains. One yeast cell colony from *C. albicans* cultured on Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol-2-agar plates was grown overnight in 1 mL of Sabouraud medium, mixed with 9 mL of Sabouraud medium, and incubated for 3 h at 37 °C with gentle shaking. The yeast cells were then washed twice with phosphate buffer and the concentration of cells was estimated at A_{600} . The antifungal tests were performed by incubating mid-log phase *C. albicans* cells (5×10^3 cells mL^{-1}) in phosphate buffer with trappin-2 or its derivatives (1–30 μ M) in a final volume of 190 μ L for 3 h at 37 °C. The number of CFU was determined by plating out the yeast cells on Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol-2-agar plates.

The antifungal activity of trappin-2 and its derivative was tested against dormant and activated *A. fumigatus* conidia. To prepare dormant (metabolically quiescent) conidia, *A. fumigatus* conidia were smeared on Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol-2-agar plates and grown for 4 days at 37 °C. Phosphate buffer containing 0.1% Triton X 100 (v/v) (15 mL) was then poured over the agar surface and the conidia collected by centrifugation at 660 g for 5 min. The pellet was suspended in 15 mL of phosphate buffer, filtered through four layers of gauze and centrifuged at 660 g for 5 min. The resulting pellet was washed twice in 15 mL of phosphate buffer, centrifuged again and suspended in 10 mL of phosphate buffer. Serial dilutions of this suspension were plated out on Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol-2-agar plates to estimate the number of cells.

The swollen (metabolically active) conidia were prepared by incubating the dormant conidia for 19 h at 25 °C in Sabouraud with gentamicin sulfate (50 μ g mL^{-1}) without shaking, followed by further incubation for 2 h at 37 °C with gentle shaking. The presence of activated cells was assessed microscopically: activated, swollen cells were

approximately twice the size of dormant cells. Antifungal tests were performed by incubating various concentrations of polypeptide with dormant or activated conidia (5×10^3 cells·mL⁻¹) in phosphate buffer (final volume 190 μ L) for 3 h at 37 °C. The number of CFU was determined by plating the conidia out on Sabouraud Gentamicin Chloramphenicol-2-agar plates ($n = 5$). The number of dead fungal cells after 3 h of incubation in buffer alone (control) was $\leq 2\%$.

The effect of NaCl on antibacterial and antifungal activity was assessed by incubating the polypeptides with bacteria or yeast cells in phosphate buffer containing 0.3 M NaCl.

Heparin binding assays

The heparin-binding capacities of trappin-2 and elafin were assessed by affinity chromatography using heparin-Sepharose. Trappin-2 or elafin (~ 15 μ g) was loaded onto a micro-column containing 300 μ L of heparin-Sepharose gel that had been equilibrated in 25 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4). The column was washed with the same buffer to remove unbound proteins and fractions were eluted with the equilibrium buffer containing 0.15, 0.3 and 1 M NaCl. These eluate fractions were analyzed using high-resolution Tricine SDS/PAGE gels according to Schagger and von Jagow [39]. The proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane and analyzed by western blotting [40] using rabbit polyclonal anti-trappin-2 serum prepared in our laboratory.

The effect of heparin on the antibacterial and antifungal activities of trappin-2 and elafin was evaluated using the above procedure, except that heparin was first incubated with the polypeptide for 30 min (heparin : polypeptide molar ratio = 10 : 1) before incubating with the bacteria/fungi.

Fibronectin degradation by *A. fumigatus* culture supernatant

A. fumigatus was cultured as described in [41,42]. Briefly, 10^6 spores in 100 mL of water containing 1% yeast carbon base (Difco, Elancourt, France) and 1% insoluble elastin were incubated at 37 °C with gentle stirring for 2 days. The culture supernatant was obtained by centrifugation at 2000 g for 20 min at 4 °C. *A. fumigatus* supernatant (5, 10 and 15 μ L) was incubated with 0.8 μ g of human fibronectin (Sigma) in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) for 90 min at 37 °C in a final volume of 20 μ L. The inhibition of fibronectin breakdown by trappin-2 and trappin-2 A62D/M63L was tested by adding each molecule (10^{-7} M final concentration) to the above incubation. The reactions were stopped by adding 20 μ L of Laemmli SDS buffer without reducing agents. The samples were then boiled and separated by SDS/PAGE (10% gels) [43]. Human fibronectin and/or its proteolytic fragments were detected by western blotting using rabbit polyclonal anti-fibronectin serum (Sigma) diluted 1 : 15 000.

Trappin-2 degradation by *C. albicans* culture supernatant

C. albicans was cultured as described above and cells collected by centrifugation of the culture (50 mL) at 4500 g for 20 min at 4 °C. The supernatant (15 μ L) was incubated with trappin-2 (2.5×10^{-7} M) or elafin (3.5×10^{-7} M) in 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) (20 μ L final volume) for 15 min to 4 h at 37 °C. The effect of class-specific protease inhibitors was tested by incubating the *C. albicans* supernatant with trappin-2 for 90 min plus 50 μ M pepstatin, AEBSF, E64 or leupeptin. Protein fragments were analyzed by high-resolution Tricine SDS/PAGE and western blotting using anti-trappin-2 sera.

SEM

The effect of trappin-2 on *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *C. albicans* was examined by SEM. Bacterial or fungal cells ($\sim 4 \times 10^7$ CFU·mL⁻¹) were incubated with 5 μ M trappin-2 in phosphate buffer (300 μ L final volume) for 3 h at 37 °C with gentle stirring. They were then washed twice with phosphate buffer and collected by centrifugation (4500 g for 10 min at 20 °C). Cells (one drop of bacteria suspended in phosphate buffer) were placed on a Thermanox™ (Oxford Instruments, Saclay, France) coverslip, fixed for 2 h with glutaraldehyde (1%, v/v) and paraformaldehyde (4%, v/v) in 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) and post-fixed with 2% (v/v) osmium tetroxide in the same buffer for 1 h in the dark. Samples were dehydrated through an acetone series (50–90%), dried using a CO₂ critical point dryer and coated with 5 nm of platinum. The samples were examined in a Zeiss Gemini DSM 982 scanning electron microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) using an acceleration voltage of 5 kV.

Data analysis

Data obtained in the antibacterial and antifungal assays ($n = 5$) are expressed as a percentage of surviving CFU after incubation with inhibitor as median values. The results from individual assays are shown as point-to-point curves from which the MED (i.e. the minimum amount of polypeptide required to significantly kill bacteria/fungi) was determined. Data were analysed using the nonparametric Friedman test for paired groups of data ($n \geq 3$).

Acknowledgements

We thank Professor Agnès Rosenau (Department of Microbiology, University of Tours) for providing the bacterial strains and for technical assistance with the antibacterial activity procedures. We also thank Dr Fabien Lecaille for helpful discussions about the

statistical analysis of experimental data and Claude Lebos (Département des Microscopies, PPF Analyse des Systèmes Biologiques, University of Tours) for performing the SEM analysis. The English text was edited by Dr Owen Parkes. K. B. holds a joint doctoral fellowship from Inserm and the Région Centre (France).

References

- Moreau T, Baranger K, Dadé S, Dallet-Choisy S, Guyot N & Zani ML (2008) Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the cheloni-anin family. *Biochimie* **90**, 284–295.
- Grutter MG, Fendrich G, Huber R & Bode W (1988) The 2.5 Å X-ray crystal structure of the acid-stable pro-teinase inhibitor from human mucous secretions analy-sed in its complex with bovine alpha-chymotrypsin. *EMBO J* **7**, 345–351.
- Tsunemi M, Matsuura Y, Sakakibara S & Katsube Y (1996) Crystal structure of an elastase-specific inhibitor elafin complexed with porcine pancreatic elastase deter-mined at 1.9 Å resolution. *Biochemistry* **35**, 11570–11576.
- Schalkwijk J, Chang A, Janssen P, De Jongh GJ & Mier PD (1990) Skin-derived antileucoproteases (SKALPs): characterization of two new elastase inhibi-tors from psoriatic epidermis. *Br J Dermatol* **122**, 631–641.
- Wiedow O, Schroder JM, Gregory H, Young JA & Christophers E (1990) Elafin: an elastase-specific inhibi-tor of human skin. Purification, characterization, and complete amino acid sequence. *J Biol Chem* **265**, 14791–14795.
- Sallenave JM & Ryle AP (1991) Purification and char-acterization of elastase-specific inhibitor. Sequence homology with mucus proteinase inhibitor. *Biol Chem Hoppe Seyler* **372**, 13–21.
- Guyot N, Zani ML, Berger P, Dallet-Choisy S & Moreau T (2005) Proteolytic susceptibility of the serine protease inhibitor trappin-2 (pre-elafin): evidence for tryptase-mediated generation of elafin. *Biol Chem* **386**, 391–399.
- Nara K, Ito S, Ito T, Suzuki Y, Ghoneim MA, Tachi-bana S & Hirose S (1994) Elastase inhibitor elafin is a new type of proteinase inhibitor which has a transglu-taminase-mediated anchoring sequence termed ‘cemen-toin’. *J Biochem* **115**, 441–448.
- Guyot N, Zani ML, Maurel MC, Dallet-Choisy S & Moreau T (2005) Elafin and its precursor trappin-2 still inhibit neutrophil serine proteinases when they are covalently bound to extracellular matrix proteins by tissue transglutaminase. *Biochemistry* **44**, 15610–15618.
- Hiemstra PS, Maassen RJ, Stolk J, Heinzl-Wieland R, Steffens GJ & Dijkman JH (1996) Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect Immun* **64**, 4520–4524.
- Wiedow O, Harder J, Bartels J, Streit V & Christophers E (1998) Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **248**, 904–909.
- Eisenberg SP, Hale KK, Heimdal P & Thompson RC (1990) Location of the protease-inhibitory region of secretory leukocyte protease inhibitor. *J Biol Chem* **265**, 7976–7981.
- Tomee JF, Hiemstra PS, Heinzl-Wieland R & Kauffman HF (1997) Antileukoprotease: an endogenous protein in the innate mucosal defense against fungi. *J Infect Dis* **176**, 740–747.
- Meyer-Hoffert U, Wichmann N, Schwichtenberg L, White PC & Wiedow O (2003) Supernatants of *Pseudo-monas aeruginosa* induce the *Pseudomonas*-specific anti-biotic elafin in human keratinocytes. *Exp Dermatol* **12**, 418–425.
- Simpson AJ, Maxwell AI, Govan JR, Haslett C & Sallenave JM (1999) Elafin (elastase-specific inhibitor) has anti-microbial activity against gram-positive and gram-negative respiratory pathogens. *FEBS Lett* **452**, 309–313.
- McMichael JW, Maxwell AI, Hayashi K, Taylor K, Wallace WA, Govan JR, Dorin JR & Sallenave JM (2005) Antimicrobial activity of murine lung cells against *Staphylococcus aureus* is increased in vitro and in vivo after elafin gene transfer. *Infect Immun* **73**, 3609–3617.
- Simpson AJ, Wallace WA, Marsden ME, Govan JR, Porteous DJ, Haslett C & Sallenave JM (2001) Adeno-viral augmentation of elafin protects the lung against acute injury mediated by activated neutrophils and bac-terial infection. *J Immunol* **167**, 1778–1786.
- Yenugu S, Richardson RT, Sivashanmugam P, Wang Z, O’Rand MG, French FS & Hall SH (2004) Antimicro-bial activity of human EPPIN, an androgen-regulated, sperm-bound protein with a whey acidic protein motif. *Biol Reprod* **71**, 1484–1490.
- Hagiwara K, Kikuchi T, Endo Y, Huqun, Usui K, Takahashi M, Shibata N, Kusakabe T, Xin H, Hoshi S *et al.* (2003) Mouse SWAM1 and SWAM2 are antibac-terial proteins composed of a single whey acidic protein motif. *J Immunol* **170**, 1973–1979.
- Nair DG, Fry BG, Alewood P, Kumar PP & Kini RM (2007) Antimicrobial activity of omwaprin, a new member of the waprin family of snake venom proteins. *Biochem J* **402**, 93–104.
- Zani ML, Nobar SM, Lacour SA, Lemoine S, Boudier C, Bieth JG & Moreau T (2004) Kinetics of the inhibi-tion of neutrophil proteinases by recombinant elafin

- and pre-elafin (trappin-2) expressed in *Pichia pastoris*. *Eur J Biochem* **271**, 2370–2378.
- 22 Latge JP (2001) The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends Microbiol* **9**, 382–389.
- 23 Naglik J, Albrecht A, Bader O & Hube B (2004) *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol* **6**, 915–926.
- 24 dos Santos AL, de Carvalho IM, da Silva BA, Portela MB, Alviano CS & de Araujo Soares RM (2006) Secretion of serine peptidase by a clinical strain of *Candida albicans*: influence of growth conditions and cleavage of human serum proteins and extracellular matrix components. *FEMS Immunol Med Microbiol* **46**, 209–220.
- 25 Bellemare A, Vernoux N, Morisset D & Bourbonnais Y (2008) Human pre-elafin inhibits *Pseudomonas aeruginosa* secreted peptidase and prevents its proliferation in complex media. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 483–490.
- 26 Brown KL & Hancock RE (2006) Cationic host defense (antimicrobial) peptides. *Curr Opin Immunol* **18**, 24–30.
- 27 McMichael JW, Roghanian A, Jiang L, Ramage R & Sallenave JM (2005) The antimicrobial antiproteinase elafin binds to lipopolysaccharide and modulates macrophage responses. *Am J Respir Cell Mol Biol* **32**, 443–452.
- 28 Efremov RG, Volynsky PE, Dauchez MAM, Nolde DE, Arseniev AS & Alix AJ (2001) Assessment of conformation and energetics of the N-terminal part of elafin via computer simulations. *Theor Chem Acc* **106**, 55–61.
- 29 Singh PK, Tack BF, McCray PB Jr & Welsh MJ (2000) Synergistic and additive killing by antimicrobial factors found in human airway surface liquid. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **279**, L799–L805.
- 30 Sorensen OE, Follin P, Johnsen AH, Calafat J, Tjabringa GS, Hiemstra PS & Borregaard N (2001) Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* **97**, 3951–3959.
- 31 Witko-Sarsat V, Halbwachs-Mecarelli L, Schuster A, Nusbaum P, Ueki I, Canteloup S, Lenoir G, Descamps-Latscha B & Nadel JA (1999) Proteinase 3, a potent secretagogue in airways, is present in cystic fibrosis sputum. *Am J Respir Cell Mol Biol* **20**, 729–736.
- 32 Ball TB, Iqbal SM & Plummer FA (2006) Trappin-2 (elafin) inhibits HIV. International Patent Application No. WO2006122404.
- 33 Challacombe SJ & Naglik JR (2006) The effects of HIV infection on oral mucosal immunity. *Adv Dent Res* **19**, 29–35.
- 34 Tjabringa GS, Vos JB, Olthuis D, Ninaber DK, Rabe KF, Schalkwijk J, Hiemstra PS & Zeeuwen PL (2005) Host defense effector molecules in mucosal secretions. *FEMS Immunol Med Microbiol* **45**, 151–158.
- 35 Peschel A & Sahl HG (2006) The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat Rev Microbiol* **4**, 529–536.
- 36 Okumura Y, Ogawa K & Uchiya K (2007) Characterization and primary structure of elastase inhibitor, AFLEI, from *Aspergillus flavus*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* **48**, 13–18.
- 37 Lode H, Allewelt M, Balk S, De Roux A, Mauch H, Niederman M & Schmidt-Ioannas M (2007) A prediction model for bacterial etiology in acute exacerbations of COPD. *Infection* **35**, 143–149.
- 38 Higuchi R, Krummel B & Saiki RK (1988) A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions. *Nucleic Acids Res* **16**, 7351–7367.
- 39 Schägger H & von Jagow G (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368–379.
- 40 Zani M, Brillard-Bourdet M, Lazure C, Juliano L, Courty Y, Gauthier F & Moreau T (2001) Purification and characterization of active recombinant rat kallikrein rK9. *Biochim Biophys Acta* **1547**, 387–396.
- 41 Frosco M, Chase T Jr & Macmillan JD (1992) Purification and properties of the elastase from *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **60**, 728–734.
- 42 Okumura Y, Ogawa K & Nikai T (2004) Elastase and elastase inhibitor from *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* and *Aspergillus niger*. *J Med Microbiol* **53**, 351–354.
- 43 Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVE

Conclusion générale et perspectives

I. Conclusion générale

Les trois protéases à sérine majeures de neutrophile, l'HNE, la CatG et la Pr3, sont des protéases dont l'activité enzymatique est nécessaire pour organiser la réponse immunitaire innée et la réaction inflammatoire. Ces protéases vont être libérées dans le milieu et participer aux remaniements de la matrice extracellulaire, entraîner la production de médiateurs pro- et anti-inflammatoires, l'activation des cellules environnantes via des récepteurs de surface comme les PARs et activer/inhiber de nombreuses cytokines et chimiokines. L'activité protéolytique bénéfique des NSPs peut très vite devenir délétère si les protéases ne sont pas régulées par leurs inhibiteurs endogènes. Un déséquilibre de la balance protéase/anti-protéase peut en effet être impliqué dans le développement de pathologies pulmonaires comme les BPCO.

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans le cadre du développement d'une thérapie anti-inflammatoire pulmonaire basée sur l'administration d'anti-protéases par aérosol, ciblant les trois NSPs. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à de petits inhibiteurs protéiques endogènes, de la famille des chélonianines, le SLPI, l'élafine et son précurseur la trappine-2 (T2) (Moreau *et al.*, 2008). Le SLPI inhibe l'HNE et la CatG et l'élafine/T2 inhibe l'HNE et la Pr3. Ces inhibiteurs possèdent également d'autres propriétés biologiques d'intérêt en particulier des activités anti-microbiennes et anti-inflammatoires, ce qui font de ces inhibiteurs de bonnes bases moléculaires pour le développement de nouveaux inhibiteurs dans l'optique d'une utilisation thérapeutique. La T2 possède une extension de 38 acides aminés en N-terminal, appelée domaine cémentoïne. Ce domaine cémentoïne est riche en séquence répétée GQDPVK, séquence consensus substrat de transglutaminase tissulaire. Sous l'action des transglutaminases, la T2, qui possède 5 séquences de transglutamination et l'élafine, qui n'en possède qu'une seule, peuvent être fixés de façon covalente aux protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et l'élastine. L'activité inhibitrice de ces inhibiteurs est maintenue lorsqu'ils sont fixés. Cette propriété d'ancrage nous semble importante car elle permettrait d'augmenter la biodisponibilité de ces inhibiteurs au niveau pulmonaire après leur administration.

Les propriétés anti-microbiennes de l'élafine et de la T2 ont été décrites pour la première fois par Simpson *et al.* en 1999 (Simpson *et al.*, 1999). Dans cette étude, il a été

montré que l'élafine et la T2 possèdent des activités anti-microbiennes vis-à-vis de pathogènes à Gram positif et négatif comme *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Ces inhibiteurs semblent être actifs à de faibles concentrations ($<5 \mu\text{M}$) vis-à-vis de *P. aeruginosa* et à de plus fortes concentrations ($25 \mu\text{M}$) vis-à-vis de *S. aureus*. Il a également été montré que la T2 est plus active que l'élafine. L'élafine est un inhibiteur cationique de charge nette +3 à pH7. Le domaine cémentoïne confère à la T2 une charge nette plus élevée de +7 à pH7. Comme pour le SLPI (Hiemstra *et al.*, 1996), il semblerait que le caractère cationique de ces deux inhibiteurs soit impliqué dans ces activités anti-microbiennes. De plus le SLPI, qui possède une charge nette de +12 à pH7, présente des propriétés anti-fongiques vis-à-vis de deux pathogènes eucaryotes que sont *A. fumigatus* et *C. albicans* (Tomee *et al.*, 1998). A ce jour, ni le mécanisme d'action ni les propriétés anti-fongiques éventuelles de la T2 n'ont été décrits.

Le premier objectif de ma thèse a donc été d'évaluer et de caractériser les propriétés anti-microbiennes et anti-fongiques de la T2 vis-à-vis d'un panel de souches de bactéries et de champignons à tropisme pulmonaire. Nous avons testé différentes souches de pathogènes dont *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* mais également *K. pneumoniae*, *B. catarrhalis*, *H. influenzae* et *S. pneumoniae* pour les bactéries et *C. albicans* et *A. fumigatus* pour les champignons (Baranger *et al.*, 2008).

Nous avons montré que la T2 possède une activité bactéricide et fongicide maximale entre $15\text{-}30 \mu\text{M}$ vis-à-vis de toutes les souches testées, sauf pour *K. pneumoniae* et *H. influenzae* où l'activité bactéricide maximale a été observée à $5 \mu\text{M}$. Afin de caractériser le mécanisme d'action de la T2, nous avons développé un inhibiteur atténué de la T2 appelé T2 A62D/M63L. Cet inhibiteur n'inhibe plus la Pr3 et présente une valeur de K_i vis-à-vis de l'HNE de $3,5 \cdot 10^{-8} \text{ M}$, valeur 1000 fois supérieure à celle de la T2 sauvage. Aucune différence de l'activité anti-microbienne n'a été observée entre la T2 et la T2 A62D/M63L, ce qui signifie que la fonction inhibitrice de protéase n'est pas impliquée dans cette activité. Nous avons également montré que la T2 peut se lier à l'héparine. En présence d'héparine et de NaCl, les activités bactéricides et fongicides sont inhibées ce qui confirme, comme pour le SLPI, l'implication du caractère cationique de l'inhibiteur. Dans cette étude, nous avons également comparé les activités anti-bactériennes et anti-fongiques de l'élafine avec celles de la T2. Le domaine cémentoïne semble jouer un rôle important et confirme l'implication des charges de l'inhibiteur. Nous avons observé, en microscopie électronique à balayage, les effets de la T2 sur *P. aeruginosa*, *S. aureus* et *C. albicans*. Pour ces trois souches, il semble que la T2 agit de la même façon. On observe des modifications importantes de la structure membranaire, en particulier la formation de plis et de pores, qui conduisent à la rupture des

membranes et à l'expulsion du cytoplasme des cellules. Ce mode d'action semble être commun aux différents peptides cationiques anti-microbiens impliqués dans la défense immunitaire innée comme les défensines (Morgera *et al.*, 2008) et la LL-37 (Oren *et al.*, 1999).

Chaque pathogène possède un arsenal protéolytique qu'il va pouvoir sécréter lors de l'infection pour envahir les tissus environnants. Parmi les différentes souches bactériennes ou fongiques testées dans cette étude, seule une activité protéolytique de type « élastase », dans le surnageant de culture d'*A. fumigatus*, est inhibée spécifiquement par la T2 mais pas par le mutant atténué. La même activité protéolytique a été détectée dans une autre souche d'*A. fumigatus*, isolée d'un patient atteint de mucoviscidose. Ces données impliquent que les inhibiteurs endogènes peuvent également inhiber des protéases d'origine microbienne. Nous avons testé l'efficacité du SLPI pour inhiber cette activité, mais seule la T2 semble être efficace. Cette nouvelle propriété place la T2 au centre de l'organisation de la réponse immunitaire lors d'une infection par *A. fumigatus* en contrôlant la croissance de ce pathogène et en inhibant les enzymes microbiennes sécrétées.

Les différentes propriétés biologiques du SLPI et de la T2 font de ces molécules de bons candidats pour une utilisation en thérapie anti-inflammatoire. Ces deux inhibiteurs inhibent l'HNE, le SPLI inhibe la CatG et la l'élafine et la T2 inhibent la Pr3. Les serpins MNEI (serpine intracellulaire) et l' α 1-PI, sont capables de cibler les trois NSPs. Dans les LLBAs de patients, une faible concentration de MNEI est détectée. L' α 1-PI inhibe la Pr3 et la CatG *in vitro* mais cette serpine reste l'inhibiteur principal de l'HNE *in vivo* au niveau alvéolaire. De nombreuses études ont été réalisées sur le développement d'inhibiteurs d'HNE. Bien que la CatG et la Pr3 soient libérées de la même façon et dans les mêmes concentrations, peu d'études se sont intéressées aux rôles de ces protéases dans le processus inflammatoire et au bénéfice de leur inhibition.

Le second objectif de ma thèse a donc été de caractériser de nouveaux inhibiteurs polyvalents, dérivés du SLPI, de l'élafine et de la T2, capables d'inhiber les trois NSPs solubles et celles liées aux membranes des neutrophiles et de se fixer de façon aux protéines de la matrice extracellulaire sous l'action de transglutaminases (Zani *et al.*, Publication n°2).

Différentes approches ont été utilisées pour produire ces inhibiteurs polyvalents : 1/ La fusion du domaine élafine, inhibiteur d'HNE et de Pr3, et du domaine 2 du SLPI, inhibiteur de l'HNE et de la CatG. Les deux inhibiteurs produits sont appelés Elaf-SLPI2 (Chimère 1) et SLPI2-Elaf (Chimère 2). 2/ Des mutations ponctuelles dans la boucle inhibitrice de la T2 en

position P1 : mutant T2 A62L et en P3, P1 et P'7 : mutant T2 R60Q/A62L/R69F. Nous avons remplacé les acides aminés de la boucle inhibitrice de la T2 par ceux à la même position dans la boucle inhibitrice du SLPI. 3/ Un inhibiteur d'HNE et de CatG capable de se fixer aux protéines de la matrice extracellulaire : CemSLPI₂ et CemAQLSPI₂. Ces différents inhibiteurs ont été produits dans le système de production *Pichia pastoris* comme la T2 et l'élafine (Zani *et al.*, 2004).

Les chimères 1 et 2 se sont révélées être de très bons inhibiteurs des trois NSPs. Les valeurs de K_i obtenues vis-à-vis des trois NSPs sont du même ordre que celles obtenues avec les deux inhibiteurs sauvages l'élafine et le SLPI. En effet, pour la chimère 1 les valeurs de K_i avec l'HNE, la Pr3 et la CatG sont $2,2 \cdot 10^{-11}$ M, $7,6 \cdot 10^{-11}$ M et $3,9 \cdot 10^{-11}$ M respectivement. La chimère 2 présente des valeurs de K_i similaires pour l'HNE et la CatG mais plus élevée pour la Pr3 ($43 \cdot 10^{-11}$ M). Les valeurs de K_i et les valeurs élevées des constantes de vitesse d'association (k_{ass} compris entre $4 \cdot 10^7$ et $1 \cdot 10^8$ M⁻¹.s⁻¹) confèrent aux chimères un caractère d'inhibiteur pseudo-irréversible.

La seconde stratégie a consisté à utiliser la T2 comme base moléculaire pour développer un inhibiteur polyvalent. Nous avons réalisé différentes mutations au niveau de la boucle inhibitrice. Nous avons remplacé le P1 de la T2 qui est une Alanine par une Leucine qui correspond au P1 dans la boucle inhibitrice du SLPI. Cet inhibiteur est appelé la T2 A62L. Grâce à une approche de modélisation moléculaire, nous avons construit un complexe CatG/élafine. L'analyse de ce complexe montre que deux acides aminés: l'Arg60 et l'Arg69, situés à proximité des résidus P1 et P'1 de l'élafine, entraînent un chevauchement de charges positives entre l'inhibiteur et la protéase. Dans le SLPI, qui inhibe la CatG, ces deux résidus sont remplacés par des acides aminés non chargés, Gln70 et Phe79. Nous avons produit un dérivé de la T2 appelé T2 R60Q/A62L/R69F qui possède la structure de la T2 et les résidus P3, P1 et P'7 du SLPI.

La simple mutation du P1 de la T2 par le P1 du SLPI permet à la T2 A62L d'inhiber la CatG sans perdre les propriétés inhibitrices vis-à-vis de l'HNE et de la Pr3. La valeur de K_i vis-à-vis de l'HNE ($1,5 \cdot 10^{-11}$ M) est du même ordre que celle de la T2 sauvage ($3 \cdot 10^{-11}$ M). Pour la Pr3, la T2 A62L présente une valeur de K_i 20 fois supérieure à celle de la T2 sauvage. Pour la CatG, la T2 A62L présente une valeur de K_i environ 30 fois supérieure à celle du SLPI sauvage. La T2 R60Q/A62L/R69F n'inhibe que l'HNE et la CatG avec une valeur de K_i 6 fois inférieure à celle de la T2 pour l'HNE et une valeur de K_i environ 16 fois supérieure à celle du SLPI pour la CatG.

Les chimères et la T2 A62L sont également capables d'inhiber les NSPs liées aux membranes des neutrophiles. Bien que les études sur l'inhibition des NSPs liées aux membranes soient controversées, nous avons montré dans cette étude que l'inhibition de ces protéases par les chimères et la T2 A62L est dépendante de la concentration en inhibiteur. La Pr3 semble être l'enzyme la moins sensible aux inhibiteurs testés et corrèle le fait que les inhibiteurs présentent des valeurs de K_i plus élevées vis-à-vis de cette protéase.

L'élafine et la T2 sont capables de se lier à différentes protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine et la vitronectine, sous l'action de transglutaminase, tout en conservant leurs propriétés inhibitrices. Dans ce contexte, nous avons testé si ces inhibiteurs polyvalents possèdent les mêmes propriétés de transglutamination que les molécules sauvages. La T2 A62L et, de façon plus surprenante, les chimères sont capables de se fixer à la fibronectine et à l'élastine par transglutamination et restent inhibiteurs des trois NSPs.

La troisième stratégie a consisté à produire un inhibiteur consistant en la fusion du domaine cémentoïne de la T2 avec le domaine 2 du SLPI. Ainsi cet inhibiteur doit pouvoir inhiber la CatG et l'HNE et acquérir une possibilité d'ancrage par le domaine cémentoïne. Ces inhibiteurs pourraient être utilisés en co-administration avec de la T2 pour cibler les trois NSPs à la fois. Nous avons développé deux inhibiteurs : le CemSLPI₂ et le CemAQLSPI₂. Le CemSLPI₂ consiste en la fusion du domaine cémentoïne de la T2 et du domaine 2 du SLPI. Le CemAQLSPI₂ possède en plus du domaine cémentoïne, les deux premiers acides aminés de l'élafine, y compris la Gln impliquée dans la réaction de transglutamination *in vivo* (Steinert et Marekov, 1995).

Ces deux inhibiteurs présentent des valeurs de K_i similaires à celles du SLPI sauvage. Ils se comportent de la même façon que le SLPI vis-à-vis des protéases liées aux membranes. Ils sont capables de se lier à la fibronectine et à l'élastine sous l'action d'une transglutaminase et restent inhibiteurs d'HNE et de CatG. Le CemAQLSPI₂ semble être un meilleur substrat de transglutamination que le CemSLPI₂.

En vue d'une utilisation en thérapie anti-inflammatoire, l'administration en aérosol nécessite une grande quantité d'inhibiteur. Les chimères sont produites en trop faibles quantités pour ce type d'étude. En revanche, la T2 A62L, comme la T2, est produite en grande quantité dans notre système de production. Cet inhibiteur polyvalent semble donc être un candidat idéal pour contrôler l'activité des trois NSPs dans les différents processus inflammatoires.

Le troisième objectif de ma thèse a été d'étudier les propriétés de transglutamination du SLPI puis d'identifier les différents résidus, de l'élafine, de la T2 et du SLPI, impliqués dans la réaction de transglutamination *in vitro*. Cette étude permettra d'identifier les Lys impliquées dans la réaction de transglutamination, de celles qui ne le sont pas. Ainsi, des mutations sur ces résidus pourront ensuite être réalisées de façon à limiter la protéolyse de l'inhibiteur.

Afin de caractériser les résidus importants dans la réaction de transglutamination, nous avons utilisé la dansyl-cadavérine (DsC) et différents peptides substrats de transglutaminase, en particulier de la transglutaminase 2 (TGase2), obtenus par phage display (Sugimura *et al.*, 2006). Le DsC possède une fonction amine réactive qui va lui permettre de réagir avec la chaîne latérale d'une Gln sous l'action de la TGase2. Le peptide PGGQQIV, dérivé de la séquence de la fibronectine et le HQSYVDPWMLDH, obtenu par phage display sont deux peptides substrats de transglutaminase qui vont interagir avec les Lys des inhibiteurs sous l'action de la TGase2. Les produits des différentes réactions sont ensuite analysés en spectrométrie de masse de façon à observer les modifications de masses (fixation de molécules).

En ce qui concerne l'élafine, les résultats préliminaires montrent que les deux Gln de la molécule sont impliquées dans cette réaction de transglutamination. De manière plus intéressante, nous avons détecté que deux Lys sont impliquées dans cette réaction. Dans la littérature, seule la Lys₄₄ a été décrite. Pour la T2, seule la caractérisation des Gln a été effectuée. Il semble que, dans nos conditions, toutes les Gln de l'inhibiteur soient impliquées. Pour le SLPI, nous avons montré pour la première fois que le SLPI est substrat de la TGase2. Nous avons montré que 3 Gln et probablement 3 Lys pouvaient être impliquées dans cette réaction.

Nous avons montré que le SLPI pouvait se lier à la fibronectine et à l'élastine comme la T2 grâce à la TGase2. Cette fixation n'est pas influencée lorsque le SLPI est en compétition avec des concentrations croissantes de T2, ce qui signifie que ces deux inhibiteurs possèdent des sites de fixation différents sur ces deux protéines de la matrice extracellulaire. De plus, une fois fixé sur la fibronectine et l'élastine, le SLPI conserve ses propriétés inhibitrices vis-à-vis de l'HNE et de la CatG. Nous avons montré que le domaine 2 du SLPI, le SLPI₂, se fixe beaucoup moins bien sur ces deux protéines ce qui suggère que les sites de transglutamination pourraient se situer principalement sur le domaine 1.

En parallèle de ces expériences avec la TGase2, nous avons testé une autre transglutaminase qui n'est pas tissulaire mais plasmatique, le FXIIIa. Le FXIIIa ne semble pas

présenter les mêmes spécificités de substrat que la TGase2. En effet, Sugimura *et al.* ont montré que la séquence consensus GQDPVK est un mauvais substrat pour le FXIIIa (Sugimura *et al.*, 2006). Nous avons montré que la T2, l'élafine et le SLPI peuvent être substrat du FXIIIa. L'élafine semble être un moins substrat que la T2, ce qui implique que les sites de transglutamination se situent principalement dans le domaine cémentoïne. La fixation du SLPI sur l'élastine ne semble pas être influencée par des concentrations croissantes de T2, ce qui indique que les sites de transglutamination sont différents. De plus, il semblerait que le SLPI présente plusieurs sites de fixation sur cette protéine. L'étude des différents résidus impliqués dans cette réaction est actuellement en cours.

Les trois NSPs, l'HNE, la Pr3 et la CatG, sont des protéases dont l'activité enzymatique est essentielle pour organiser la réponse immunitaire innée et la réponse inflammatoire qui y est associée. La balance protéase/anti-protéase en faveur d'une forte activité protéolytique est une des causes majeures de développement de pathologies pulmonaires inflammatoires comme les BPCO. Les BPCO sont actuellement la 5^{ème} cause de décès dans le monde et pourraient, selon l'OMS, devenir la 3^{ème} cause de décès en 2020. L'utilisation d'anti-protéases constitue donc une approche thérapeutique possible. A ce jour, il n'y a pas de traitements disponibles pour soigner les patients atteints de BPCO. Ceci peut s'expliquer par la complexité de la pathologie qui est en partie due au grand nombre de médiateurs solubles et cellulaires impliqués (Figure 53) (Barnes, 2008b).

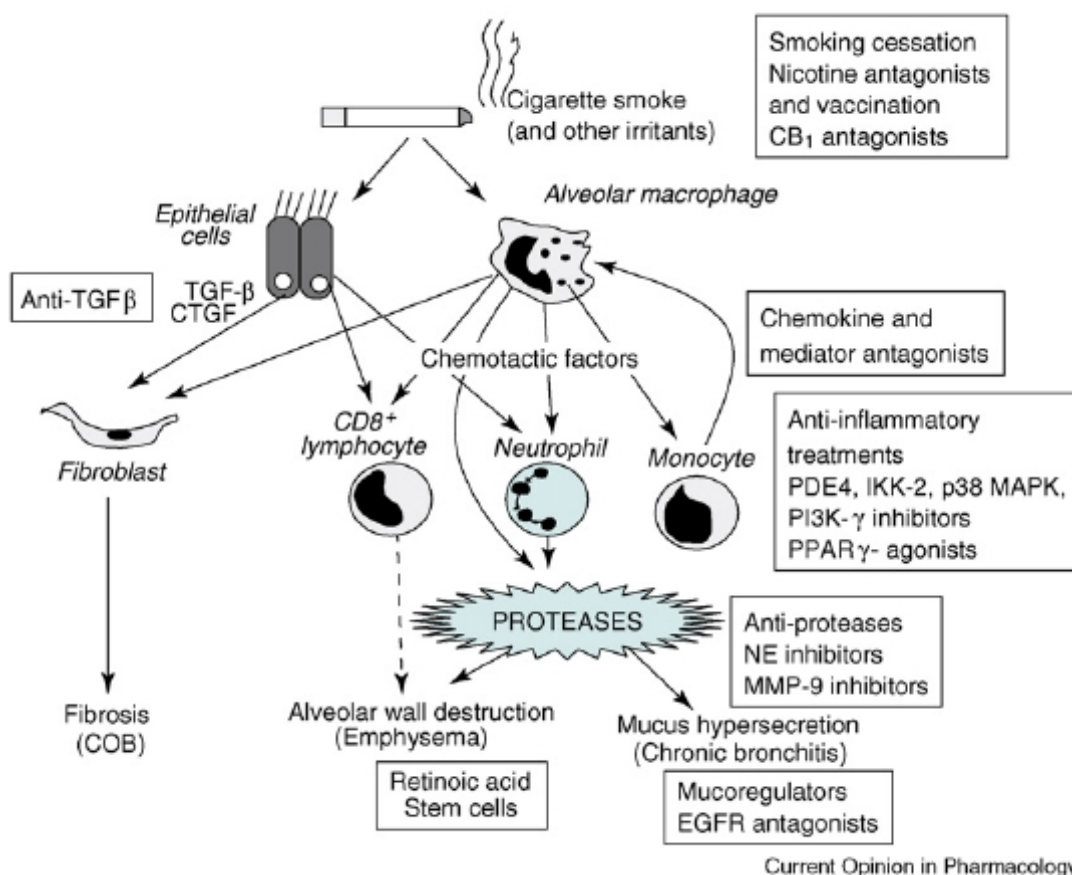


Figure 53 : Les différentes cibles possibles dans les stratégies anti-inflammatoires dans le traitement des BPCO. D'après Barnes, 2008b.

Les bronchodilatateurs comme les β 2-agonistes semblent être efficaces et sont actuellement en phase clinique d'essais. Des inhibiteurs des voies de signalisation comme des antagonistes des récepteurs aux chimiokines, le CXCR2 et le CXCR3. Chez des patients volontaires, les antagonistes du CXCR2 limitent le recrutement des neutrophiles et des macrophages réduisant ainsi l'état inflammatoire général. Des antagonistes du CXCR3 n'ont pas encore été testés chez l'homme. Des inhibiteurs des médiateurs lipidiques comme le LTB₄ sont inefficaces de même que des inhibiteurs du TNF α , utilisés aux mêmes doses qui sont efficaces dans le traitement de l'arthrite rhumatoïde et de l'asthme. D'autres cytokines peuvent être ciblées comme l'IL-6 et l'IL-1 β . Les essais avec des molécules anti-inflammatoires comme des inhibiteurs de PDE4 (phosphodiesterase 4), p38 MAP Kinase et du NF- κ B ne semblent pas être efficaces. Les patients atteints de BPCO présentent une diminution de l'activité HDAC2 (Histone Déacétylase 2). Cette diminution d'activité explique la perte d'efficacité des corticostéroïdes anti-inflammatoires. Des dérivés de la théophylline augmentent l'activité HDAC2 et semblent inverser la résistance aux corticostéroïdes. Enfin, les protéases libérées massivement par les neutrophiles et les macrophages sont fortement

impliquées dans l'apparition de l'emphysème et la surproduction de mucus conduisant à la limitation du volume respiratoire. Parmi ces protéases, les MMP-8, -9 et -12 ont été principalement ciblées de même que l'HNE. Les essais cliniques avec des inhibiteurs dirigés contre ces protéases n'ont pas été concluants (Barnes, 2008b). Le coût de production des inhibiteurs est un frein important pour une telle thérapie.

Il a clairement été établi que les trois NSPs sont impliquées dans le développement pathologie des différentes pathologies inflammatoires pulmonaires comme les BPCO et la mucoviscidose, ce qui pourrait expliquer l'inefficacité des inhibiteurs ciblant uniquement l'HNE pour maîtriser les dommages protéolytiques causés au niveau des tissus pulmonaires, en particulier dans le cadre des BPCO.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à de petits inhibiteurs endogènes des NSPs de la famille des chélonianines, appelés SLPI, inhibiteur d'HNE et de CatG, l'élafine et son précurseur la trappine-2, inhibiteurs d'HNE et de Pr3. Ces inhibiteurs possèdent de nombreuses propriétés biologiques comme des activités anti-inflammatoires, indépendantes de leur fonction inhibitrice de protéases, des activités immuno-modulatrices et des propriétés anti-bactériennes (Moreau *et al.*, 2008). Ces différentes propriétés font de ces inhibiteurs des candidats potentiels dans l'optique d'une administration d'anti-protéases par aérosol en thérapie anti-inflammatoire en complément d'autres molécules anti-inflammatoires comme des inhibiteurs des cytokines ou des inhibiteurs de voies de signalisation.

II. Perspectives

En plus de ses propriétés inhibitrices, ses propriétés anti-inflammatoires et anti-microbiennes confèrent à la T2 un intérêt thérapeutique certain. Un dérivé de la T2, comme la T2 A62L qui est un inhibiteur polyvalent, semble donc être par conséquent un candidat idéal pour démarrer des études sur la caractérisation des aérosols. Il s'agira plus spécifiquement d'évaluer la taille des particules, la résistance des inhibiteurs à l'aérosolisation et l'étude des dépôts de l'aérosol dans les poumons. En parallèle de ces études, il serait intéressant d'étudier l'efficacité de cet inhibiteur vis-à-vis des trois NSPs en présence de cellules bronchiques *ex vivo*. Pour cela des modèles de culture cellulaire comme un épithélium bronchique reconstitué et/ou des sphéroïdes bronchiques, pourront être utilisés. La production de certains marqueurs pro-inflammatoires, en réponse aux trois NSPs et aux différents inhibiteurs, pourra être suivie comme les cytokines TNF- α et IL-6, les chimiokines comme l'IL-8 ainsi que certaines MMPs

comme les MMP-7 et MMP-9 et les mucines comme MUC5AC. Ces études pourront être poursuivies chez l'animal, en particulier dans le modèle murin de BPCO induite par la fumée de cigarette.

D'un point de vue fondamental, il serait intéressant d'étudier les activités anti-mycobactériennes de la T2 et de l'élafine. En effet, les deux domaines du SLPI murin et le domaine 1 du SLPI humain présentent des acides aminés chargés positivement (Lys et Arg) entre la première et la troisième cystéine. Ces résidus, situés sur la boucle externe des domaines sont exposés et semblent être critiques pour l'activité anti-mycobactérienne mais moins cruciaux pour l'activité anti-bactérienne (Nishimura *et al.*, 2008). A l'inverse du second domaine du SLPI humain, entre la première et la troisième cystéine, qui correspond à la boucle inhibitrice, la T2 possède deux résidus chargés Arg₆₀ en P3 et Arg₆₉ en P'7. Il est à noter que le domaine 2 du SLPI murin possède également deux résidus chargés en P7 (Lys) et en P3 (Arg). Ces éléments laissent supposer que l'élafine et la T2 pourraient avoir des propriétés anti-mycobactériennes qui seraient intéressantes à étudier dans le cadre de la recherche de nouvelles molécules ciblant *Mycobacterium tuberculosis*.

Le SLPI et la T2 possèdent des propriétés immuno-modulatrices. Ces deux inhibiteurs sont capables de lier le LPS des bactéries à Gram négatif et ainsi de moduler l'effet pro-inflammatoire de cet antigène (McMichael *et al.*, 2005 ; Yang *et al.*, 2005). Les éventuelles interactions de ces deux inhibiteurs avec les antigènes des bactéries à Gram positif comme l'acide lipotéichoïque et les galacto-mannanes d'*A. fumigatus*, qui sont également de puissantes molécules pro-inflammatoires, pourraient donc être étudiées. Nos travaux ont montré que la T2 et la T2 A62L peuvent inhiber l'activité de type élastase produite par *A. fumigatus* (Baranger *et al.*, 2008). Il semblerait que cette activité « élastase » soit présente dans plus de 95% des souches d'*A. fumigatus* isolées chez les patients (Alp et Arikan, 2008). Une étude récente a montré qu'une co-administration d'un inhibiteur d'HNE produit par *A. flavus* (AFLEI) et d'amphotéricine B, traitement utilisé en clinique contre les infections fongiques, dans un modèle murin d'aspergillose pulmonaire, est plus efficace que le traitement par l'amphotéricine B seul (Okumura *et al.*, 2008). Une expérience à réaliser serait d'étudier les propriétés anti-inflammatoires de la T2 et la T2 A62L, dans un modèle murin similaire d'aspergillose pulmonaire, en co-administration avec de l'amphotéricine B. Chez les patients immunodéprimés ou en cours de chimiothérapie, une co-administration de T2 et d'amphotéricine B pourrait prévenir des infections par ces pathogènes opportunistes.

Les transglutaminases tissulaires, sur-exprimées dans des conditions inflammatoires, sont essentielles pour activer les phospholipases. Les phospholipases A₂ (PLA₂), par exemple,

catalysent l'hydrolyse des phospholipides en position *sn*-2 conduisant à la génération d'acide arachidonique. Ce dernier est le précurseur de puissants médiateurs de l'inflammation comme les leucotriènes et les prostaglandines. Ces enzymes jouent un rôle important dans différentes pathologies inflammatoires comme l'arthrite rhumatoïde, les conjonctivites allergiques et le SDRA (Touqui et Alaoui-El-Azher, 2001). En 2003, Sohn *et al.* ont montré que les séquences PVKG, DPVKG et GQDP, issues du domaine cémentoïne de la T2, limitent l'activité enzymatique des PLA₂ (Sohn *et al.*, 2003). Ils ont également produit des inhibiteurs correspondant à la fusion de la séquence GQDP à une séquence consensus se retrouvant dans les anti-flammines, KVLD, séquence inhibitrice de l'activité enzymatique des PLA₂. Ce peptide KVLDGQDP est un excellent inhibiteur des PLA₂, il présente des propriétés anti-inflammatoires et diminue le recrutement des éosinophiles dans un modèle de conjonctivite allergique (Sohn *et al.*, 2003). Dans ce contexte, il serait donc intéressant d'étudier les effets anti-inflammatoires de l'élafine, de la T2 et de la T2 A62L sur l'expression de la TGase2, l'activité enzymatique des PLA₂ et sur la régulation de la réaction inflammatoire (recrutement des neutrophiles, activité des protéases à sérine) dans un modèle animal de SDRA.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A.

Kévin BARANGER

**DEVELOPPEMENT D'UNE STRATEGIE
THERAPEUTIQUE ANTI-INFLAMMATOIRE EN
PATHOLOGIE PULMONAIRE BASEE SUR
L'ADMINISTRATION D'ANTI-PROTEASES**



Résumé

Les travaux de cette thèse ont porté sur l'étude des propriétés fonctionnelles d'inhibiteurs recombinants polyvalents ciblant les trois protéases à sérine du neutrophile (élastase, protéase 3, cathepsine G), libérées massivement au cours des inflammations pulmonaires.

Ces inhibiteurs, dérivés de molécules naturelles (élafine, trappine-2, SLPI), interagissent fortement avec les trois protéases à sérine, sous leur forme soluble ou liée aux membranes des neutrophiles et possèdent des propriétés anti-bactériennes indépendantes de leur capacité inhibitrice. De plus, nous avons montré que ces inhibiteurs peuvent être ancrés à différentes protéines de structure par transglutamination tout en conservant leurs propriétés inhibitrices.

Ces inhibiteurs représentent des molécules particulièrement attractives dans le cadre du développement d'une stratégie thérapeutique basée sur l'administration d'anti-protéases par aérosol.

Mots-clés : Neutrophiles, protéases à sérine, inhibiteurs, trappine-2, SLPI, inflammation pulmonaire.

Résumé en anglais

In this study, we have analysed the properties of recombinant polyvalent inhibitors of the three neutrophil serine proteinases (elastase, proteinase 3, cathepsin G), massively released during inflammatory events in various lung diseases.

These inhibitors, derived from natural endogenous inhibitors (elafin, trappin-2, SLPI), interact tightly with both free and membrane-bound neutrophil serine proteinases and possess antimicrobial properties that are independent from their inhibitory capacity. We have also shown that these polyvalent inhibitors can be covalently bound to the extracellular matrix proteins by a transglutaminase and that they retain their inhibitory properties in these conditions.

With their various biological properties, these inhibitors are attractive molecules for the development of an aerosol-based therapeutic strategy for the treatment of inflammatory lung diseases.

Key-words : Neutrophils, serine proteinases, inhibitors, trappin-2, SLPI, lung inflammation.