

ÉCOLE DOCTORALE SST

Unité INSERM U618 : Protéases et Vectorisation Pulmonaires

THÈSE

présentée par :

Clément NAUDIN

soutenue le : **9 décembre 2011**

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

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

Régulation de l'activité de la protéine du surfactant SP-A par les cathepsines à cystéine pulmonaires :

Conséquences sur les propriétés antibactériennes de SP-A

THÈSE dirigée par :

M LALMANACH Gilles

Professeur, Université François – Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :

M PIDARD Dominique

Chargé de Recherche CNRS, HDR, Paris

M TOUQUI Lhousseine

Directeur de Recherche INSERM, Institut Pasteur, Paris

JURY :

M DEHAYE Jean-Paul

Professeur, Université Libre de Bruxelles, Bruxelles, Belgique

M LALMANACH Gilles

Professeur, Université François – Rabelais, Tours

M LECAILLE Fabien

MCU, HDR, Université François – Rabelais, Tours

M PIDARD Dominique

Chargé de Recherche CNRS, HDR, Paris

M TOUQUI Lhousseine

Directeur de Recherche INSERM, Institut Pasteur, Paris

M VANDIER Christophe

Professeur, Université François - Rabelais, Tours

Remerciements

Ce travail a été effectué au sein de l'unité INSERM U618 « Protéases et Vectorisation Pulmonaires » sous la direction du Professeur Gilles Lalmanach.

Dans un premier temps, je tiens à remercier l'association « Vaincre La Mucoviscidose » qui a financé cette étude et m'a permis de réaliser cette thèse.

Je tiens également à exprimer mes remerciements à :

Monsieur Gilles Lalmanach, Professeur de l'Université François-Rabelais de Tours, pour avoir assuré la direction scientifique de cette thèse. A travers ses compétences, son enthousiasme, sa disponibilité et son soutien, il m'a permis d'effectuer cette thèse dans d'excellentes conditions.

Monsieur Dominique Pidard, Chargé de Recherche CNRS à l'INSERM (Paris), et Monsieur Lhousseine Touqui, Directeur de Recherche INSERM (Paris), pour m'avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail.

Monsieur Jean-Paul Dehay, Professeur à l'Université Libre de Bruxelles (Bruxelles), et Monsieur Christophe Vandier, Professeur à l'Université François-Rabelais, d'avoir accepté d'être les examinateurs de cette thèse.

Monsieur Fabien Lecaille, Maître de Conférences à l'Université François-Rabelais, pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Je tiens également à lui adresser toute ma reconnaissance pour sa disponibilité, ses conseils judicieux et avisés, sa bonne humeur et pour tout le travail effectué sur cette étude.

Monsieur Francis Gauthier, Professeur à l'Université François-Rabelais, pour m'avoir accueilli au sein de son unité.

Et je tiens à adresser mes sincères remerciements à :

Alix Joulin-Giet, pour m'avoir supporté pendant la rédaction, pour sa joie, son entrain, nos discussions riches et sa participation à ce travail.

Ahlame Saïdi, pour son enthousiasme et son caractère déterminé.

Michèle Brillard, décédée cette année, pour avoir réalisé les analyses de séquençage et qui était d'une grande gentillesse et toujours présente.

Amanda Kravtsoff et Yaël Victor, étudiantes que j'ai eu le plaisir d'encadrer durant leur stage dans l'unité, pour leur participation à ce travail.

Florian Veillard, pour son esprit critique et son aide précieuse durant les deux premières années.

Juliette Sage, pour sa gentillesse et sa présence durant ces trois ans.

Mariana Kasabova, pour sa bonne humeur et son soutien moral.

Annabelle Tanga et Noémie Michel, arrivées en thèse en même temps que moi, pour leur présence et nos discussions riches et rafraichissantes.

Marie-Louise Zani, pour ses conseils avisés, son soutien et son tempérament enjoué.

Annick Esnard et Frédérique Esnard, pour leurs conseils et nos discussions enrichissantes sur des domaines plus que variés.

Christophe Epinette, mon « frère d'armes », pour m'avoir aidé à décompresser quand j'en avais besoin.

Mimsy, amie de longue date, pour m'avoir accompagné, soutenu et pour son amitié sans faille.

Je remercie également tous les autres membres du laboratoire :

Thierry Moreau, Baris Korkmaz, Virginie Hervé-Grépinet, Sandrine Dallet-Choisy, Sylvie Atucci, Yves Courty, Sophie Iochman, Pascale Reverdiau, Nathalie Riche et Estelle Nocchi, pour leur présence et leurs conseils.

Mes autres compagnons en thèse, passés et actuels, Alexandre, Kévin, Guillaume, Marion, Alice, Thomas et Laurent, pour les soirées et leur simplicité.

Je n'oublie pas les autres étudiants et post-docs du laboratoire dont je remercie leur convivialité comme Gwenhael, Audrey et Salim, ainsi que tous les autres membres du laboratoire.

Je remercie mes amis de Tours et d'ailleurs : Marmotte, Vince, Elodie, Sarah, JL, Fred, Lilou, Tramber et Jen, pour leur soutien durant ces trois années et leur amitié.

Enfin, je remercie ma famille, mes parents, ma sœur, mon frère et ma cousine Pauline en particulier, pour m'avoir soutenu et encouragé.

Résumé

Les cathepsines à cystéine (CP) participent à la dégradation du tissu bronchique ainsi qu'à l'inactivation de protéines de l'immunité innée lors de maladies inflammatoires. Lors de la mucoviscidose (CF), on observe un déficit de la protéine du surfactant pulmonaire SP-A, qui participe à la défense antimicrobienne. Nous avons caractérisé les CP dans des expectorations CF et analysé leur capacité à hydrolyser le SP-A. La balance CP/inhibiteurs est déséquilibrée en faveur des CP et la cathepsine B participe à ce déséquilibre en hydrolysant leurs inhibiteurs, les kininogènes. Cependant, les CP ne sont pas des marqueurs de colonisation par *Pseudomonas aeruginosa*. De plus, la cathepsine S clive sélectivement SP-A dans son site de liaison aux sucres et aux lipides, induisant la perte de ses propriétés antibactériennes et d'agrégation, contribuant au déficit de la défense innée, à la perte d'homéostasie du surfactant et à l'exacerbation de l'inflammation au cours de la mucoviscidose.

Mots clefs : Cathepsines à cystéine, mucoviscidose, kininogènes, protéines du surfactant, SP-A

Résumé en anglais

Cysteine cathepsins (CP) that are implicated in bronchial tissue injuries and inactivation of antibacterial proteins emerge as key players in pulmonary inflammations. A decrease of pulmonary surfactant protein SP-A which is involved in innate host defence has been reported in patients suffering from cystic fibrosis (CF). We characterized sputum CP and their ability to hydrolyze SP-A. There is an imbalance CP/inhibitor tipped in favor of CP proteolytic activities. Furthermore, cathepsin B, which is able to degrade major plasma CP inhibitor, kininogens, favors this imbalance. However, CP are not biomarkers of colonization by *Pseudomonas aeruginosa*. Moreover, Cat S cleaves SP-A specifically in its lectin-like domain (CRD) that conducts to the loss of antibacterial and aggregation properties. So, CP, especially cathepsin S, participate to the deficiency of innate immunity, surfactant homeostasis defect and to the exacerbation of inflammatory response in cystic fibrosis.

Keywords: Cysteine cathepsins, cystic fibrosis, kininogens, surfactant proteins, SP-A

Table des matières

Remerciements	3
Résumé	7
Résumé en anglais	9
Table des matières	11
Liste des tableaux	15
Liste des figures	17
Liste des annexes	19
Publications liées à la thèse	21
Abréviations	23
Introduction	25
I- Revue bibliographique	31
1. La mucoviscidose	33
1.1. Généralités	34
1.1.1. Structure du canal CFTR	34
1.1.2. Fonctions de la protéine CFTR	34
1.2. Physiopathologie de la mucoviscidose	35
1.2.1. Infection pulmonaire et inflammation	35
1.2.2. Désordres gastro-intestinaux	36
1.3. Diagnostic	37
1.4. Traitements	39
1.4.1. Infection et inflammation pulmonaire	39
1.4.2. Transplantation pulmonaire	42
1.4.3. Insuffisance pancréatique et nutrition	42
1.4.4. Traitement ayant pour cible la protéine CFTR	43
2. Les cathepsines à cystéine	45
2.1. Généralités	47
2.1.1. Classification et phylogénie	47
2.1.2. Structures	49
2.1.3. Fonctionnement et organisation du site catalytique	51
2.1.4. Particularités des exopeptidases	52
2.1.5. Spécificité enzymatique des cathepsines à cystéine	54
2.1.6. Localisation cellulaire des cathepsines	54

2.2.	Régulation des cathepsines à cystéine.....	56
2.2.1.	Inhibition par la prorégion.....	56
2.2.2.	Inhibiteurs naturels spécifiques : Superfamille des cystatines	58
2.2.3.	Inhibiteurs naturels non spécifiques des cathepsines	61
2.2.4.	Autres inhibiteurs endogènes	61
2.2.5.	Régulation par le pH, les glycosaminoglycanes et le stress oxydatif.....	62
2.2.6.	Inhibiteurs synthétiques.....	64
2.3.	Fonctions physiologiques et physiopathologiques des cathepsines à cystéine	66
2.3.1.	Fonctions physiologiques	66
2.3.2.	Fonctions physiopathologiques	68
2.4.	Les cathepsines à cystéine pulmonaires	76
2.4.1.	L'inflammation pulmonaire	76
2.4.2.	BPCO et emphysème	79
2.4.3.	Asthme et allergie.....	80
2.4.4.	Autres pathologies pulmonaires	81
3.	La protéine SP-A du surfactant pulmonaire	83
3.1.	Le surfactant.....	85
3.1.1.	Les phospholipides.....	85
3.1.2.	Les protéines hydrophobes : SP-B et SP-C.....	86
3.1.3.	Les protéines hydrophiles : les collectines SP-A et SP-D.....	88
3.1.4.	Synthèse et dégradation du surfactant pulmonaire.....	89
3.1.5.	Les pathologies pulmonaires associées au surfactant	91
3.2.	La protéine SP-A du surfactant pulmonaire	96
3.2.1.	Structure	96
3.2.2.	Interactions avec les phospholipides	99
3.2.3.	Liaison aux pathogènes	101
3.2.4.	Récepteurs cellulaires.....	104
3.2.5.	Régulation de l'immunité.....	104
4.	Cathepsines, immunité innée et mucoviscidose	111
4.1.	Surfactant dans la mucoviscidose	111
4.1.1.	Les lipides	111
4.1.2.	Les protéines du surfactant pulmonaire	112
4.2.	Protéines du surfactant et protéolyse.....	112

4.2.1.	Protéases de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	112
4.2.2.	Protéases à sérine du neutrophile	113
4.2.3.	Allergènes d'acariens	114
4.3.	Régulation physiologique des protéines hydrophobes par les cathepsines	115
4.4.	Cathepsines et immunité	115
4.5.	Cathepsines dans la mucoviscidose.....	116
II-	Travaux personnels	119
1.	Balance cathepsines/inhibiteurs dans la mucoviscidose	123
2.	Mécanisme d'inhibition de la cathepsine B par les kininogènes	133
3.	Régulation de la protéine du surfactant, SP-A, par les cathepsines	149
3.1.	Introduction	149
3.2.	Matériel et méthodes	151
3.2.1.	Enzymes et inhibiteurs	151
3.2.2.	Collection d'expectorations.....	151
3.2.3.	SP-A et bactéries	151
3.2.4.	Immunodétection du SP-A dans les expectorations CF	152
3.2.5.	Hydrolyse du SP-A exogène dans les expectorations CF	152
3.2.6.	Dégradation du SP-A par les cathepsines	153
3.2.7.	Détermination des sites de clivage par la cathepsine S	153
3.2.8.	Modélisation moléculaire du SP-A humain	153
3.2.9.	Colocalisation de la cathepsine S et du SP-A par immunohistochimie	154
3.2.10.	Auto-agrégation du SP-A	154
3.2.11.	Préparation des vésicules de phospholipides et de Rc-LPS	155
3.2.12.	Agrégation des vésicules	155
3.2.13.	Cultures bactériennes	156
3.2.14.	Agglutination d' <i>Escherichia coli</i>	156
3.2.15.	Agglutination de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	157
3.2.16.	Interaction du SP-A avec le mannane	157
3.3.	Résultats et discussion.....	159
3.3.1.	Dégradation du SP-A : Implication des cathepsines à cystéine	159
3.3.2.	Régulation des propriétés d'agrégation du SP-A	164
3.3.3.	Régulation des propriétés antibactériennes du SP-A	166
3.4.	Conclusion.....	169

Conclusion générale	171
Annexes : Revues générales.....	213

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des mutations de la protéine CFTR	33
Tableau 2 : Localisation des cathepsines à cystéine pulmonaires.....	78
Tableau 3 : Composition lipidique moyenne du surfactant pulmonaire chez l'homme	85
Tableau 4 : Variation des principaux constituants du surfactant en fonction des pathologies pulmonaires	92
Tableau 5 : Surfactants exogènes	95
Tableau 6 : Activités et fonctions potentielles du SP-A liées à l'interaction avec les lipides .	99
Tableau 7 : Pathogènes liés par SP-A et SP-D.....	102
Tableau 8 : Diagramme schématique des structures de S-LPS et R-LPS de <i>Salmonella minnesota</i> O (m O) et d' <i>Escherichia coli</i>	103
Tableau 9 : Récepteurs et protéines liées par SP-A et SP-D, et fonctions associées	104

Liste des figures

Figure 1 : Principales voies pour le diagnostic de la mucoviscidose	38
Figure 2 : Structures tridimensionnelles des cathepsines B et L.....	49
Figure 3 : Structures tridimensionnelles des procathepsines B et L	50
Figure 4 : Mécanisme catalytique des protéases à cystéine	51
Figure 5 : Nomenclature de Schechter et Berger	52
Figure 6 : Caractéristiques structurales des cathepsines ayant une activité exopeptidasique ..	53
Figure 7 : Marqueurs caractéristiques des lysosomes conventionnels, des granules de sécrétion et des lysosomes sécrétoires.....	56
Figure 8 : Inhibition de la cathepsine L par des peptides recombinants dérivés de la prorégion	57
Figure 9 : Structures schématiques des kininogènes organisées en domaines.....	59
Figure 10 : Localisation des trois régions constituant le site inhibiteur de la superfamille des cystatines	60
Figure 11 : Structures du E-64, du CA-074 et d'un vinyl-sulfone (VS, Mu-Leu-Hph-VSPh). 65	
Figure 12 : Rôle des protéases à cystéine dans la présentation des antigènes par le CMH de classe II.....	67
Figure 13 : Cycle du remodelage osseux	69
Figure 14 : Origine cellulaire des protéases durant l'arthrite rhumatoïde	71
Figure 15 : Profil d'expression des différentes cathepsines à cystéine dans l'environnement tumoral	73
Figure 16 : Interaction du SP-B avec la couche lipidique du surfactant.....	87
Figure 17 : Ancrage du SP-C aux couches lipidiques du surfactant	88
Figure 18 : Métabolisme et catabolisme du surfactant pulmonaire	91
Figure 19 : Structures des collectines MBL, SP-A et SP-D.....	96
Figure 20 : Sites de fixation du calcium sur le SP-A, le SP-D et la MBP-A	98
Figure 21 : Principaux rôles de SP-A et SP-D dans l'immunité.....	109
Figure 22 : Influence de <i>P. aeruginosa</i> et des neutrophiles sur le surfactant pulmonaire	114
Figure 23 : SP-A dans les surnageants d'expectoration CF.....	159
Figure 24 : Immunolocalisation du SP-A et de la cathepsine S au niveau des alvéoles pulmonaires humaines.....	160
Figure 25 : Dégradation du SP-A par la cathepsine S.....	162
Figure 26 : Clivage du SP-A par la cathepsine S	163

Figure 27 : Auto-agrégation du SP-A et agrégation des vésicules de phospholipides et de Rc-LPS	165
Figure 28 : Agglutination bactérienne et fixation du mannane	167

Liste des annexes

Revue générale 1 :

Kininogens: More than cysteine protease inhibitors and kinin precursors

G. Lalmanach, C. Naudin, F. Lecaille & H. Fritz (2010)

Biochimie, 92(11) : 1568-79.

Revue générale 2 :

Cysteine cathepsins: markers and therapy targets in lung disorders

M. Kasabova, A. Saidi, C. Naudin, J. Sage, F. Lecaille & G. Lalmanach (2011)

Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism, 9 : 148 – 61.

Publications liées à la thèse

Articles originaux :

The occluding loop of cathepsin B prevents its effective inhibition by human kininogens
C. Naudin, F. Lecaille, S. Chowdhury, J. C. Krupa, E. Purisima, J. S. Mort & G. Lalmanach (2010)

Journal of Molecular Biology, 400 : 1022-35

Human cysteine cathepsins are not reliable markers of infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis

C. Naudin, A. Joulin-Giet, G. Couetdic, P. Plésiat, A. Szymanska, E. Gorna, F. Gauthier, F. Kasprzykowski, F. Lecaille & G. Lalmanach (2011)

PLoS ONE, 6(9): e25577. doi:10.1371/journal.pone.0025577

Regulation of antimicrobial properties of pulmonary surfactant protein SP-A by cathepsin S
F. Lecaille*, C. Naudin*, J. Sage, A. Courty, R. Veldhuizen, F. Possmayer & G. Lalmanach
(*contributions égales des auteurs)

Manuscrit en préparation

Revues générales :

Kininogens: More than cysteine protease inhibitors and kinin precursors

G. Lalmanach, C. Naudin, F. Lecaille & H. Fritz (2010)

Biochimie, 92(11) : 1568-79

Cysteine cathepsins: markers and therapy targets in lung disorders

M. Kasabova, A. Saidi, C. Naudin, J. Sage, F. Lecaille & G. Lalmanach (2011)

Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism, 9 : 148 – 61

Communications orales en lien avec la thèse (* conférencier) :

Pourquoi les kininogènes sont-ils de mauvais inhibiteurs de la cathepsine B ?

F. Lecaille *, C. Naudin, S. Chowdhury, J. Krupa, J.S Mort & G. Lalmanach

Congrès Annuel de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire - Nancy, France – 27 au 29 août 2009

Why cathepsin B is weakly inhibited by kininogens? Putative consequences on the protease-antiprotease imbalance during cystic fibrosis

C. Naudin*, F. Lecaille, A. Joulin-Giet, S. Chowdhury, F. Kasprzykowski, J. C. Krupa, G. Couetdic, P. Plésiat, J. S. Mort & G. Lalmanach

28th Winter School on Proteinases and their Inhibitors – Tiers, Italy – 23 au 27 février 2011

Regulation of antibacterial properties of the pulmonary surfactant protein (SP-A) by cysteine cathepsins

C. Naudin*, F. Lecaille, R.A.W. Veldhuizen, F. Possmayer & G. Lalmanach

5th European CF Young Investigator Meeting - Lille, France – 23 au 26 août 2011

A new partner of innate immunity? Cathepsin S impairs antimicrobial properties of the lung surfactant protein A (SP-A)

F. Lecaille, C. Naudin, R.A.W. Veldhuizen, F. Possmayer & G. Lalmanach*

7th general meeting of the international proteolysis society – San Diego, Etats-Unis – 16 au 20 octobre 2011

Abréviations

ADAM	<i>a desintegrin and a metalloprotease domain</i>
SDR(A)	syndrome de détresse respiratoire (aigü)
BPCO	broncho-pneumopathie chronique obstructive
DBP	dysplasie broncho-pulmonaire
CA-074	N-(L-3-trans-propylcarbomoyl-oxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline
CF	<i>cystic fibrosis</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CRD	<i>carbohydrate recognition domain</i>
CD	cellule dendritique
DPPC	dipalmitoylphosphatidylcholine
DPPG	dipalmitoylphosphatidylglycérol
DTT	dithiothréitol
E-64	1-N-(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl) L-leucyl amino-4-guanidinobutane
EDTA	acide éthylène diamine tétracétique
GAG	glycosaminoglycane
HMWK	<i>high molecular weight kininogen</i>
IL	interleukine
CL	corps lamellaires
LDL	<i>low molecular lipoprotein</i>
LLBA	liquide de lavage broncho-alvéolaire
LMWK	<i>low molecular weight kininogen</i>
LPS	lipopolysaccharide
MBP	<i>mannose-binding protein</i>
MMP	<i>matrix metalloprotease</i> , ou métalloprotéase matricielle
CMV	corps multi-vésiculaire
PBL	<i>proregion binding loop</i>
SLPI	<i>secretory leukoprotease inhibitor</i>
SP	<i>surfactant protein</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TM	tubules de myéline
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>

Introduction

La mucoviscidose (CF, *Cystic Fibrosis*) est une maladie génétique rare et héréditaire qui touche plus particulièrement les populations caucasiennes. En France, un enfant sur 4000 environ est touché par la maladie, 6000 personnes, enfants et adultes, sont atteintes, et 70 000 dans le monde. Les mutations à l'origine de cette maladie ont lieu au niveau du chromosome 7 dans un gène codant pour un canal chlore, le canal CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Plus de 1500 mutations ont été décrites jusqu'à présent mais la plus fréquemment rencontrée est la mutation $\Delta F508$ qui regroupe 70 % des patients. Le rôle physiologique de ce canal est de réguler l'échange d'ions et d'eau au niveau des épithéliums, permettant ainsi de maintenir leur homéostasie. Dans la mucoviscidose, les mutations du gène codant pour ce canal entraînent la synthèse d'une protéine défectueuse, tronquée ou bien encore incorrectement adressée à la membrane cellulaire. Ceci a pour conséquences une viscosité anormale des sécrétions au niveau des muqueuses et un taux élevé de sels dans la sueur. Il en résulte principalement des difficultés respiratoires et digestives. Au niveau pulmonaire, la viscosité du mucus ainsi que son abondance entraîne la perte de la clairance mucociliaire ce qui a pour conséquence de favoriser les infections pulmonaires. Ainsi, les patients atteints de mucoviscidose (patients CF) ont pour symptômes des infections pulmonaires chroniques. Parmi les pathogènes responsables de ces infections on retrouve principalement *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae*. Associée à l'infection, on observe également une inflammation pulmonaire chronique de l'épithélium respiratoire. Ces deux phénomènes entraînent une perte des capacités respiratoires, première cause d'incapacité et de mortalité chez les patients CF.

L'inflammation pulmonaire se caractérise par le recrutement massif de cellules de l'immunité comme les neutrophiles, majoritairement, ainsi que les macrophages. Ces cellules libèrent des quantités massives d'enzymes protéolytiques et ceci est associé à un déséquilibre de la balance protéases / anti-protéases. Ce défaut de régulation de l'activité protéolytique a pour conséquence la dégradation des tissus bronchiques, la détérioration de la fonction respiratoire mais également l'altération des mécanismes de défense antimicrobiens. Il a été montré depuis de nombreuses années l'implication des protéases à sérine, en particulier l'élastase du neutrophile, dans la dégradation des constituants de la matrice extracellulaire, principalement le collagène et l'élastine. Les protéases à sérine sont également impliquées dans le déficit de l'immunité observé au cours de la mucoviscidose. L'élastase du neutrophile est par exemple capable de dégrader les fragments du complément qui s'associent à la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*, principal pathogène des patients CF, ainsi que les récepteurs présents sur les

neutrophiles inhibant ainsi l'interaction et la clairance de ce pathogène. Par conséquent, ces protéases participent à l'exacerbation de l'état infectieux des patients et à l'installation de l'inflammation chronique.

A côté de ces protéases, le rôle des cathepsines à cystéine pulmonaires n'est pas encore bien établi. Les cathepsines étaient à l'origine connues pour leur rôle, principalement lysosomal, dans la dégradation et le recyclage intracellulaire des protéines internalisées. Cependant, depuis une vingtaine d'années, des études montrent l'implication des cathepsines à cystéine dans de nombreux processus spécifiques tant physiologiques que physiopathologiques. Au niveau pulmonaire, elles sont principalement sécrétées par les macrophages alvéolaires et sont retrouvées sous forme active au niveau extracellulaire. De plus, il a été montré un déséquilibre de la balance cathepsines / anti-cathepsines dans des maladies inflammatoires aiguës et chroniques. Elles seraient, comme beaucoup d'études le montrent, impliquées également dans la dégradation des constituants de la matrice extracellulaire pulmonaire, de la membrane basale et des fibres d'élastine. Dans la mucoviscidose, en plus de leur implication dans la destruction des tissus bronchiques, ces enzymes participeraient à l'inactivation de peptides et protéines antimicrobiens, ce qui en fait des acteurs potentiels du déficit de l'immunité. Il est par conséquent primordial de comprendre leur rôle physiopathologique dans cette maladie inflammatoire et infectieuse. Ainsi ces protéases pourraient être des cibles alternatives de choix dans un traitement thérapeutique à l'aide d'inhibiteurs spécifiques.

Parmi les peptides et protéines antimicrobiens pulmonaires, il existe les protéines spécifiques du surfactant. Le surfactant pulmonaire est un mélange complexe de lipides et de protéines localisé à l'interface air-liquide des alvéoles. Grâce à ses propriétés physiques, il s'oppose au collapsus alvéolaire et participe activement à la mécanique respiratoire. En outre, il est également composé de deux protéines spécifiques, les collectines SP-A et SP-D, qui possèdent des activités antimicrobiennes et participent à l'immunité innée ainsi qu'adaptative. Ces deux protéines ont une action directe sur les pathogènes mais sont également impliquées dans la régulation des cellules de la réponse inflammatoire et immune. Au cours de la mucoviscidose, il a été montré que la composition en phospholipides du surfactant est anormale et que les propriétés tensio-actives du surfactant sont diminuées. En ce qui concerne la protéine SP-A du surfactant pulmonaire, les études font état de différentes évolutions mais il en ressort que la proportion de SP-A augmente au cours des premiers mois chez les enfants atteints et infectés, pour ensuite diminuer chez les enfants plus âgés. De plus, SP-A est

retrouvé dégradé dans les fluides pulmonaires (lavages et expectorations). Cette dégradation suggère que SP-A, qui est activement associé aux mécanismes de défense contre les pathogènes au niveau pulmonaire, pourrait être la cible de clivages protéolytiques et il est important de déterminer les protéases pouvant être impliquées dans ce déficit.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont consisté à analyser l'implication des cathepsines à cystéine dans la mucoviscidose selon trois axes. Dans un premier temps, nous avons étudié la balance cathepsines / inhibiteurs dans les expectorations de patients CF afin d'établir si les cathepsines, comme l'élastase, pourraient être des cibles thérapeutiques pertinentes dans la physiopathologie des patients CF. La deuxième partie du travail a consisté à évaluer l'implication de la cathepsine B dans le déséquilibre de la balance cathepsines / inhibiteurs. En effet, la cathepsine B est la cathepsine active majoritaire dans les fluides pulmonaires de patients atteints d'inflammations chroniques et aiguës, et elle est mal régulée par les principaux inhibiteurs circulants spécifiques des cathepsines, les kininogènes. De plus ceux-ci sont retrouvés dégradés dans ces mêmes fluides. Enfin, nous avons analysé la capacité des cathepsines à réguler la protéine SP-A et en particulier l'influence de cette régulation sur ses propriétés antimicrobiennes. En effet, certaines protéases de pathogènes et de neutrophiles sont déjà proposées comme étant impliquées dans le déficit en SP-A mais l'intervention d'autres protéases reste à élucider. Les cathepsines pourraient être impliquées et ainsi, ajoutées aux peptides et protéines antimicrobiens qu'elles inactivent, avoir une influence notable sur l'état infectieux et inflammatoire des patients CF.

I- Revue bibliographique

1. La mucoviscidose

La mucoviscidose est une maladie héréditaire qui touche environ 1 naissance sur 3000 aux Etats-Unis et en Europe et qui affecte les populations caucasiennes. Elle entraîne des désordres multi-viscéraux avec principalement une atteinte pulmonaire et digestive. Cette maladie fait l'objet de nombreuses études afin de mieux la comprendre et d'élaborer des traitements pouvant améliorer la vie des patients. La mucoviscidose est causée par des mutations dans un gène de 230 kb présent sur le chromosome 7 qui code pour une protéine-canal de 1480 résidus appelée CFTR pour *Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator* (Riordan *et al.*, 1989). Cette protéine est un canal chlore exprimé au niveau des membranes épithéliales. Plus de 1500 mutations sur ce gène sont décrites et celles-ci peuvent être regroupées en 6 groupes selon l'expression et l'état du canal CFTR (Vankeerberghen *et al.*, 2002): 1/ Les mutations nulles, le canal n'est pas synthétisé ; 2/ Les mutations entraînant un problème d'adressage à la membrane dont fait partie la mutation la plus rencontrée, $\Delta F508$; 3/ Le canal est adressé à la membrane mais n'est pas activable ; 4/ Les mutations entraînant un défaut de conductance ; 5/ Les ARNm de taille normale codant pour le canal sont faibles et peu de protéines fonctionnelles sont exprimées ; 6/ Les mutations affectant la régulation des autres canaux par le canal CFTR (Tableau 1). Les groupes 1 à 3 sont les plus rencontrés, en particulier le groupe 2 avec la mutation $\Delta F508$ qui, en Europe, représente jusqu'à plus de 80 % des patients atteints dans certains pays (Morral *et al.*, 1994).

Tableau 1 : Classification des mutations de la protéine CFTR
(D'après Vankeerberghen *et al.*, 2002)

Classe	Exemple de mutations	Phénotype moléculaire/cellulaire associé
I	W1282X	Absence de production de CFTR due à des mutations non-sens, ou des mutations altérant la conformation ou l'épissage des ARN messagers.
II	$\Delta F508$	Métabolisme intracellulaire anormal du CFTR avec peu de protéine au niveau des membranes apicales
III	G551D	Défaut de régulation du canal CFTR au niveau des membranes apicales
IV	R117H	Défaut de la perméabilité ionique via le canal CFTR
V	3849+10KbC>T	Diminution de la synthèse de CFTR normal
VI	Q1412X	Diminution du temps de résidence du canal et C-terminus tronqué

1.1. Généralités

1.1.1. Structure du canal CFTR

Le canal CFTR est constitué de 2 domaines transmembranaires, 6 hélices par domaine, formant le pore, et de 3 domaines intracellulaires. L'activation de la protéine se fait par phosphorylation du domaine régulateur par des protéines kinases, en particulier la protéine kinase A dépendante de l'AMPc (Cheng *et al.*, 1991). L'activité du canal est ensuite gouvernée par deux domaines de liaison aux nucléotides (NBD ou *nucleotide-binding domain*) qui régulent l'ouverture (Borst & Elferink, 2002). La région C-terminale, en particulier les trois derniers résidus (thréonine, arginine, leucine), ancre la protéine à un récepteur de type PDZ, récepteur en relation avec des récepteurs membranaires, des protéines de signalisation ainsi que le cytosquelette (Short *et al.*, 1998).

1.1.2. Fonctions de la protéine CFTR

1.1.2.1. Canal ionique

Le canal CFTR est hautement sélectif aux anions monoatomiques, en particulier les ions chlorure, mais il laisse également passer les cations monovalents comme les ions sodium (Anderson *et al.*, 1991). Bien que les boucles intracytoplasmiques jouent un rôle prédominant dans la formation du pore du canal, la sélectivité des ions est principalement due aux résidus constitutifs des boucles extracellulaires (Seibert *et al.*, 1997). Outre le passage d'ions, le canal CFTR est également perméable à des anions polyatomiques comme NO_3^- (Linsdell *et al.*, 1997) ainsi qu'au glutathion, l'antioxydant majeur des poumons (Linsdell & Hanrahan, 1998).

1.1.2.2. Régulation de la conductance membranaire

Avant d'être connue pour ses fonctions de canal chlorure, la protéine CFTR était connue pour être impliquée dans la régulation de la conductance membranaire. La protéine CFTR régule de nombreux canaux ioniques comme le canal ORCC (*outwardly rectifying chloride channel*), un canal chlore régulé par l'AMPc (Schwiebert *et al.*, 1999) et le canal sodium épithélial ou ENaC (Mall *et al.*, 1998). Elle serait également capable de réguler des canaux potassium (Loussouarn *et al.*, 1996).

1.2. Physiopathologie de la mucoviscidose

Le dysfonctionnement de la protéine CFTR (et donc du flux ionique au niveau des épithéliums) entraîne un défaut d'hydratation des muqueuses, ce qui perturbe un certain nombre d'organes exprimant ce canal tels que les sinus, les poumons, le pancréas, le foie et le tractus reproductif. Cependant, au niveau pulmonaire, la destruction du tissu bronchique et la diminution des capacités respiratoires sont les premières causes de morbidité et de mortalité chez les patients CF (Ramsey, 1996).

1.2.1. Infection pulmonaire et inflammation

Les manifestations pulmonaires des patients CF sont une viscosité élevée des sécrétions, un défaut des mécanismes de clairance, une infection bactérienne chronique et une inflammation. Le défaut de sécrétion de chlore associé au canal CFTR et aux autres canaux entraîne la déshydratation des sécrétions endo-bronchiales et diminue la clairance muco-ciliaire. Il est clairement établi que cela a pour conséquence l'obstruction des voies respiratoires et empêche l'élimination des bactéries (Donaldson *et al.*, 2006). Les principaux pathogènes affectant les voies respiratoires des patients sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* et *Burkholderia cepacia*. D'autres pathogènes sont également impliqués mais leurs rôles sont moins connus.

Ainsi, les patients souffrent d'infections bactériennes associées à une inflammation chronique qui est exacerbée par un défaut de réponse immune. Les sécrétions pulmonaires des patients CF sont riches en neutrophiles, cytokines et chimiokines. L'épithélium respiratoire est une importante source d'interleukine-8 (IL-8), une chimiokine CXC, qui est le principal chimioattractant des neutrophiles dans les poumons des patients CF (Bonfield *et al.*, 1995; Strieter, 2002). Les cellules épithéliales pulmonaires modulent également la production d'IL-1, de TNF- α (ou *tumor necrosis factor- α*) et d'autres médiateurs qui participent au recrutement des cellules de l'immunité incluant les neutrophiles et les macrophages (Greally *et al.*, 1993). Les macrophages sécrètent des cytokines qui participent à la réponse inflammatoire en médiant la dégranulation et le chimiotactisme des neutrophiles, et également la production d'IL-8 par les cellules épithéliales et immunitaires. Ajouté à cela, le taux d'IL-17 est élevé chez les patients CF et celle-ci est impliquée dans le recrutement des neutrophiles pulmonaires et dans la défense immune contre les bactéries à Gram négatif (McAllister *et al.*, 2005). De plus, les neutrophiles relarguent par dégranulation un certain

nombre de protéases, dont l'élastase du neutrophile, qui sont primordiales dans la lutte contre les pathogènes. Cependant, ces protéases ne sont pas régulées par leurs inhibiteurs naturels chez les patients CF, et leur pouvoir protéolytique associé à leur nombre fait qu'elles participent à la destruction du tissu bronchique (Brockbank *et al.*, 2005) et interfèrent avec l'immunité innée en détériorant l'opsonisation par les cellules phagocytaires (Birrer, 1993). D'autre part, de l'ADN, provenant des déchets cellulaires et de la mort programmée des neutrophiles, est libéré au niveau du site inflammatoire (Marcos *et al.*, 2010), ce qui augmente la viscosité du mucus. Il existe également un stress oxydatif dû à la présence de radicaux de l'oxygène, produits par les bactéries mais également dû au phénomène inflammatoire, qui exacerbe la détérioration pulmonaire (Brown *et al.*, 1996). Tous ces phénomènes entretiennent la réponse inflammatoire pulmonaire et altèrent son contrôle.

1.2.2. Désordres gastro-intestinaux

Parmi les manifestations intestinales des patients CF, une des plus connues et qui participe au diagnostic de la maladie est l'iléus méconial. C'est une obstruction de l'iléon, causée par un bouchon de méconium, observée chez environ 15 % des nouveau-nés CF (Lai *et al.*, 2004). Le méconium représente les premières selles du nouveau-né généralement expulsées dans les premières 24 heures qui suivent la naissance. Chez les nouveau-nés CF, le méconium est déshydraté, conséquence du défaut de la protéine CFTR, et forme donc un bouchon qui peut entraîner une perforation. Un phénomène similaire a lieu chez les patients plus âgés appelé syndrome d'obstruction de l'intestin distal ou SOID (Dray *et al.*, 2004) qui a une prévalence variant considérablement allant de 2 à 40 % environ. Ce syndrome est dû à l'accumulation de matériel fécal visqueux dans la lumière de l'intestin associé au mucus déshydraté, qui adhère aux parois intestinales au niveau de l'iléum terminal et du caecum. Ce syndrome est lié aux autres symptômes de la maladie touchant les voies digestives, avec la perte de la sécrétion de bile au niveau de l'iléum entraînant la malabsorption des graisses, le dysfonctionnement neuromusculaire entérique et l'hypertrophie musculaire (Smith *et al.*, 2009; Taylor & Hardcastle, 2005).

Un des autres symptômes couramment rencontré puisqu'il touche environ 90 % des patients CF, est l'insuffisance pancréatique. Cette insuffisance est due à la diminution du volume de sécrétions associée à une faible concentration en ion hydrogénocarbonate (HCO_3^-) (Kopelman *et al.*, 1985). La faible quantité des sécrétions et d' HCO_3^- entraîne une retenue des

proenzymes digestives dans le canal de Wirsung, ou canal pancréatique principal, qui est le principal canal exocrine du pancréas. Les proenzymes sont ensuite activées prématurément conduisant au remodelage, à la destruction du tissu et/ou à la fibrose. Il en résulte une malabsorption qui participe au défaut de demande énergétique causé par l'état hypermétabolique associé à l'infection pulmonaire (Fried *et al.*, 1991; Matel & Milla, 2009).

1.3. Diagnostic

Le défaut en transport ionique est directement détectable par la forte concentration en sodium et en chlore dans la sueur, ainsi que la différence de potentiel électrique élevée au niveau de l'épithélium nasal. Ces deux phénomènes sont donc utilisés pour déterminer le statut CF d'un nouveau-né (Wilmott, 1998). Dans un premier temps, le test de la sueur est réalisé, et si la concentration en chlore dépasse 60 mmol/L, le diagnostic est positif (Figure 1). Puis le diagnostic est confirmé par une analyse génotypique des mutations les plus communes du gène CFTR. Il est à noter que si le test de la sueur n'est pas concluant, le génotypage est recommandé. Ensuite, si le diagnostic n'est toujours pas certain, la fonction du canal CFTR peut être analysée avec la mesure du potentiel électrique au niveau de l'épithélium nasal ou bien encore par une biopsie rectale (Veeze *et al.*, 1991). En dépit de ces tests, certains patients ont un diagnostic incertain.

En outre, d'autres symptômes cliniques pas forcément liés au défaut du canal CFTR peuvent aider au diagnostic comme l'insuffisance pancréatique, la faible quantité d'enzymes digestives dans les selles ou bien encore l'infection pulmonaire par un pathogène typique comme *Pseudomonas aeruginosa*.

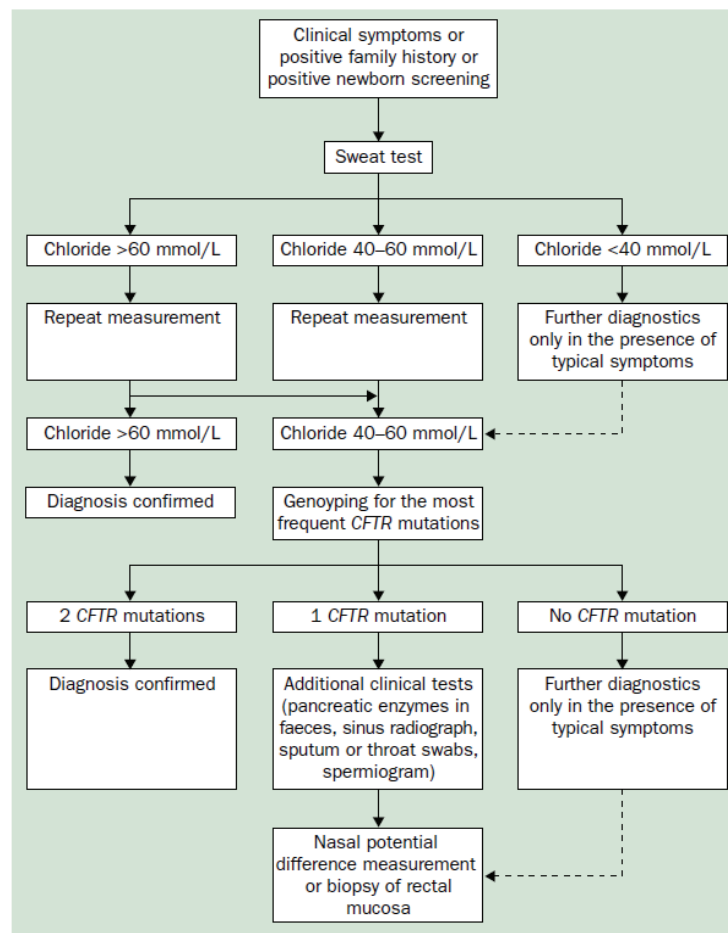


Figure 1 : Principales voies pour le diagnostic de la mucoviscidose
(Ratjen & Döring, 2003)

1.4. Traitements

La physiopathologie de la mucoviscidose n'est pas seulement liée aux mutations du gène CFTR et il est clairement établi que d'autres facteurs rentrent en jeu, comme des facteurs environnementaux ou bien géniques différents du canal CFTR (Bronsveld *et al.*, 2001). Ainsi, les patients atteints de la même mutation n'auront pas pour autant des symptômes cliniques identiques ce qui rend très difficile la mise en place du traitement. Bien qu'il n'existe pas encore de traitement touchant directement le dysfonctionnement du canal de type thérapie génique, les traitements utilisés, comme les mucolytiques, les antibiotiques et les anti-inflammatoires, ainsi que le suivi nutritionnel élaboré des patients, ont contribué de manière non négligeable à doubler leur espérance de vie sur les vingt dernières années (vingt ans à quarante ans environ) (Cystic fibrosis Foundation, 2011).

1.4.1. Infection et inflammation pulmonaire

1.4.1.1. Infection

La première stratégie de traitement est de lutter contre l'infection bactérienne pulmonaire étant donné son importance dans la physiopathologie de la maladie. En premier lieu, des mesures d'hygiène et une séparation des patients, dans la majorité des centres de traitement, sont mises en place afin de limiter les infections croisées de patients à patients (Højby & Koch, 1990). L'approche principale est l'utilisation de traitements antibiotiques pour prévenir, diminuer, voire éradiquer l'infection. Différentes classes d'antibiotiques sont utilisées en thérapeutique comme les β -lactamines (la flucloxacilline), les aminosides (la tobramycine), les fluoroquinolones (la ciprofloxacine) ou les polymyxines (la colistine) qui ont un effet bactéricide direct, ou bien encore les macrolides (l'azithromycine) avec une activité plutôt bactériostatique mais également immuno-régulatrice.

La plupart des patients sont initialement colonisés par *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae*, et sont alors traités principalement par des antibiotiques anti-staphylocoques, comme la flucloxacilline, durant des périodes plus ou moins longues, principalement par voie orale (Weaver *et al.*, 1994). Cependant des études rétrospectives montrent que le traitement continu des patients avec ce type d'antibiotiques est associé à l'augmentation du taux d'infection par *Pseudomonas aeruginosa* dans les six premières années de vie des patients

(Ratjen *et al.*, 2001a), ce qui montre la complexité de l'approche thérapeutique à laquelle doivent faire face les médecins.

Par la suite, l'infection à *Staphylococcus aureus* diminue mais elle est remplacée par la colonisation par *Pseudomonas aeruginosa*, le principal pathogène de cette maladie. La colonisation par *Pseudomonas aeruginosa* a pour conséquence directe l'augmentation de l'inflammation pulmonaire, ce qui entraîne si elle persiste, les effets néfastes connus sur les fonctions pulmonaires. Si les patients ne sont pas traités rapidement, l'infection devient chronique avec une souche mucoïde de ce pathogène (Muhlebach *et al.*, 1999). Malgré un traitement antibiotique intensif, cette souche mucoïde est très difficile à éradiquer et ceci est probablement dû à la faible pénétration des antibiotiques dans les amas de mucus anaérobies (Worlitzsch *et al.*, 2002), le développement de souches mutantes résistantes (Oliver *et al.*, 2000) et la formation de biofilm (Hassett *et al.*, 2002). L'administration des antibiotiques se fait par voie intraveineuse, mais pour éviter les effets pervers de ce type d'administration et pour augmenter la concentration en principe actif dans les voies respiratoires, elle est également réalisée par inhalation. Couramment, une combinaison d'antibiotiques (colistine, ciprofloxacine, tobramycine...) administrés par inhalation et par voie orale (Valerius *et al.*, 1991; Wiesemann *et al.*, 1998) est mise en place et ce type de traitement permet de réduire l'infection pulmonaire chronique voire même dans certains cas l'éradication du pathogène (Ratjen *et al.*, 2001b).

Parmi les antibiotiques utilisés, on distingue les macrolides, utilisés de manière standard en thérapeutique, qui possèdent une activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à Gram positif (streptocoques et staphylocoques) mais également des propriétés immuno-modulatrices (Tamaoki *et al.*, 2004). Par exemple, ils réduisent la sécrétion de mucus au niveau pulmonaire (Tamaoki *et al.*, 1995) ou bien encore ils diminuent l'expression des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8 (Takizawa *et al.*, 1997). Chez les patients CF, les principaux macrolides utilisés sont l'azithromycine (Smyth, 2006) et la clarithromycine (Pukhalsky *et al.*, 2004). De manière intéressante, ces macrolides ont un effet antibactérien direct limité sur *Pseudomonas aeruginosa* mais ils agissent de manière indirecte sur la pathogénicité de cette bactérie. Par exemple, ils inhibent la transcription de gènes impliqués dans la formation des biofilms (Donabedian, 2003) et donc facilitent l'élimination du pathogène même chez les patients atteints d'une infection chronique à ce pathogène (Saiman *et al.*, 2003).

1.4.1.2. Inflammation

Le contrôle de l'inflammation étant altéré chez les patients CF et étant donné que l'inflammation entraîne des dommages pulmonaires importants, participant à l'incapacité et à la mort des patients, il est primordial de la traiter. Les traitements utilisés ont pour cibles différents acteurs de l'inflammation comme les cellules de l'immunité, en particulier les neutrophiles et les cellules épithéliales (stéroïdes), mais vont également agir sur la viscosité du mucus (Mucolytiques et DNase).

L'obstruction des voies respiratoires due à la présence de mucus déshydraté, qui entraîne l'altération de la clairance mucociliaire et qui contribue aux difficultés respiratoires des patients CF, est traitée de manière physique par des séances de kinésithérapie régulières. En outre, pour lutter contre cette obstruction, les patients sont également soumis à l'administration de solutions salines hypertoniques qui ont pour effet de réhydrater la surface pulmonaire, d'améliorer la clairance mucociliaire et les fonctions pulmonaires (Donaldson *et al.*, 2006). Cependant ce type de traitement ne module pas l'inflammation. Pour traiter la viscosité des sécrétions pulmonaires, sont aussi utilisés des agents mucolytiques, la N-acétylcystéine (NAC) et la DNase recombinante, la dornase alpha. La NAC, outre ses propriétés mucolytiques directes, est capable à forte dose d'agir sur le stress oxydatif en augmentant le glutathion sanguin, et de diminuer l'activité de l'élastase, le taux d'IL-8 et de neutrophiles dans les sécrétions (Tirouvanziam *et al.*, 2006). De plus, elle serait également capable d'améliorer le flux de chlore et donc l'hydratation du mucus (Varelogianni *et al.*, 2010). La dornase alpha, commercialisée sous le nom Pulmozyme®, diminue la viscosité du mucus en dégradant l'ADN extracellulaire relargué par les neutrophiles (Lieberman, 1968) et permet une amélioration des fonctions pulmonaires (Jones & Wallis, 2010).

Pour agir directement sur les acteurs de l'inflammation, des traitements à base d'anti-inflammatoires stéroïdiens, administrés par voie orale ou par inhalation, sont utilisés. Cependant, leur utilisation est spécifique de l'état du patient et le traitement est réalisé à court terme car ils ont des effets secondaires néfastes (Cheng *et al.*, 2000). L'anti-inflammatoire stéroïdien principalement utilisé est la prednisone, un glucocorticoïde. Cette famille de stéroïde permet la diminution du recrutement des cellules immunitaires, inhibe leur activation, et inhibe également la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Greally *et al.*, 1994). Une alternative aux stéroïdes est l'ibuprofène qui à haute dose améliore les fonctions pulmonaires

des patients, mais en pratique il n'est pas ou peu utilisé à cause des effets secondaires qu'il induit aux niveaux gastrique, hépatique et rénal (Konstan *et al.*, 1995).

D'autres substances actives sont à l'étude pour traiter l'inflammation comme des modulateurs des leucotriènes, activateurs de neutrophiles et chimiotactiques (Schmitt-Grohé & Zielen, 2005), ainsi que des anti-cytokines (Chmiel & Konstan, 2005). D'autre part, l'utilisation d'anti-protéases en thérapeutique est à l'étude, en particulier contre l'élastase avec des aérosolisations d' α_1 -antitrypsine (Martin *et al.*, 2006) ou bien encore d'inhibiteurs synthétiques comme EPI-hNE4 (Grimbert *et al.*, 2003).

1.4.2. Transplantation pulmonaire

La transplantation pulmonaire est la seule option actuelle pour les patients en situation d'insuffisance respiratoire sévère et évolutive (Adler *et al.*, 2009). Un des critères principaux est le volume d'expiration forcée (VEF). En effet, s'il est inférieur à 30 %, les études statistiques montrent que la survie des patients à 1 et 2 ans est très faible avec les traitements classiques (Kerem *et al.*, 1992). Il existe la transplantation monopulmonaire, un seul poumon transplanté, et bipulmonaire mais la majorité des transplantations chez les patients CF sont bipulmonaires. La transplantation bipulmonaire permet d'éviter que le poumon natif soit une source infectieuse pour le poumon transplanté. La mucoviscidose est la pathologie associée aux meilleurs résultats, avec un taux de survie à 1 an et 3 ans de 84,3 % et 69,3 %, respectivement, en Europe selon le registre de l'ISHLT (The International Society for Heart and Lung Transplantation) réalisé entre 2006 et 2010. La seule contre-indication à la greffe chez les patients est l'infection à *Burkholderia cepacia* complex (ou BCC), et plus particulièrement à *Burkholderia cenocepacia* (Alexander *et al.*, 2008), mais des études récentes ont réduit la contre-indication à des souches bien particulières de ce pathogène (Murray *et al.*, 2008).

1.4.3. Insuffisance pancréatique et nutrition

L'insuffisance pancréatique touche environ 90 % des patients CF, il est donc primordial de pallier cette insuffisance. Les conséquences de celle-ci sont la diminution du volume de sécrétions, et par conséquent des enzymes pancréatiques (Kopelman *et al.*, 1985), associée à une mauvaise absorption des graisses. Ainsi, le traitement est une thérapie de substitution enzymatique, ou PERT en anglais (*pancreatic enzyme replacement therapy*), qui consiste à

apporter ces enzymes, amylases, lipases, protéases, qui ne sont plus produites de manière adéquate (Ferrone *et al.*, 2007). De plus, un statut nutritionnel pauvre est directement lié à un mauvais pronostic chez les patients. En effet, les études montrent une corrélation positive entre l'indice de masse corporelle (BMI) et les capacités respiratoires (Cystic Fibrosis Foundation, 2008). En outre, une étude récente dans un centre de traitement révèle qu'une bonne nutrition associée aux traitements classiques permet d'améliorer les fonctions respiratoires des patients, avec une diminution du taux d'infection par *Pseudomonas aeruginosa* (McPhail *et al.*, 2008).

1.4.4. Traitement ayant pour cible la protéine CFTR

A l'heure actuelle, il n'existe aucun composé utilisé en clinique pouvant réguler la protéine CFTR altérée. Cependant, de nombreuses études sont en cours et certains composés sont en phases d'essai clinique. Parmi ces composés, il y a le VX-770, développé par Vertex Pharmaceutical (Cambridge, Massachusetts, Etats Unis), qui potentialise l'activité du canal. Son action est d'augmenter la probabilité d'ouverture du canal (Van Goor *et al.*, 2009). Les essais cliniques de phase II, chez des patients ayant la mutation G551D (classe 3), révèlent une amélioration de la conductance du chlore, dépendant du canal CFTR, et des fonctions respiratoires (Accurso *et al.*, 2008). Ce composé est maintenant en essai clinique de phase III chez des patients avec la mutation G551D (Référence des essais : NCT00909532 et NCT00909727), et de phase II chez des patients homozygotes pour la mutation $\Delta F508$ (classe 2) (Référence de l'essai : NCT00953706).

D'autres composés, ayant pour but de corriger le repliement de la protéine CFTR portant la mutation $\Delta F508$, sont à l'étude et appelés « correcteurs ». Les recherches se focalisent sur différentes cibles participant à la biosynthèse de la protéine, comme les protéines chaperonnes (Rubenstein & Zeitlin, 1998), ou bien encore augmentant la demi-vie du canal, en agissant sur la machinerie cellulaire ou l'endocytose du canal (Young *et al.*, 2009). De plus, une troisième stratégie est envisagée avec les aminoglycosides ou des composés ayant une action similaire. Ces molécules permettent à la machinerie traductionnelle d'ignorer les codons stop prématurés, qui entraînent la synthèse d'une protéine CFTR tronquée (mutations de classe 1). Parmi ces molécules, l'ataluren (ou PTC124), qui n'est pas un aminoglycoside, est prometteur avec une amélioration de l'activité CFTR ainsi que des fonctions respiratoires observée chez les patients traités (Kerem *et al.*, 2008).

2. Les cathepsines à cystéine

Le terme protéase fait référence aux enzymes qui dégradent des substrats protéiques en hydrolysant les liaisons peptidiques. Chez l'homme, on dénombre 570 gènes de protéases contre 651 chez la souris (Quesada *et al.*, 2009). Les protéases sont classées selon leur mécanisme catalytique qui dépend du résidu essentiel à leur activité protéolytique. Ainsi on distingue 6 classes de protéases: les protéases à sérine, les protéases à cystéine, les protéases acides (à aspartate et à glutamate), les métalloprotéases et les protéases à thréonine (López-Otín & Bond, 2008). En ce qui concerne les protéases à cystéine, elles sont retrouvées aussi bien dans le monde animal et végétal que chez les bactéries et les virus (Rawlings & Barrett, 1994). Aujourd'hui, 72 familles de protéases à cystéine sont référencées correspondant à environ 160 protéases (Rawlings *et al.*, 2010). Parmi ces protéases, la famille la plus représentée et la plus documentée est la famille de la papaïne (clan CA, famille C1). Cette famille est présente chez les végétaux, les mammifères, les insectes ou encore les parasites.

Chez l'homme, onze protéases à cystéine, dénommées cathepsines, sont identifiées, appartenant à la famille de la papaïne : les cathepsines B, H, L, S, C, K, O, F, V, X et W. Le terme « cathepsine » s'applique également à certaines protéases acides (cathepsines D et E) et protéases à sérine (cathepsine G). C'est pourquoi, pour éviter toute ambiguïté, le terme « cathepsines à cystéine » est de plus en plus employé. Le terme cathepsine est apparu dans les années 1920 avec la découverte de protéases actives à pH acide dans les fluides digestifs (Willstätter & Bamann, 1929). La première caractérisation des cathepsines à cystéine a vu le jour avec la cathepsine C en 1948 (Gutmann & Fruton, 1948). A partir de ce jour et jusqu'aux années 1990, la découverte et la caractérisation des cathepsines se sont poursuivies avec la mise en évidence des cathepsines B, L, H et S. Jusqu'à cette période, les cathepsines à cystéine étaient essentiellement connues pour leurs activités endosomale et lysosomale, participant à la dégradation et au recyclage des protéines, avec une expression ubiquitaire, actives à pH acide (pH 5,5-6) et inactivées à pH neutre ou faiblement alcalin (excepté la cathepsine S). Cependant, depuis les quinze dernières années, l'avancée des techniques de biologie moléculaire et l'étude du génome humain a permis la découverte des autres cathepsines à cystéine, les cathepsines F, K, O, V, X et W, avec une expression non pas ubiquitaire mais spécifique à un type cellulaire. Ainsi, l'expression de la cathepsine K

(appelée anciennement O2) a été essentiellement décrite dans les ostéoclastes (Chapman *et al.*, 1997), celle de la cathepsine V dans le thymus et les testicules (Brömme *et al.*, 1999), et celle de la cathepsine W dans les lymphocytes T (Linnevers *et al.*, 1997).

De plus, des études ont révélé la présence de formes actives dans les compartiments extracellulaires, où elles sont impliquées dans la dégradation des composants de la membrane basale et la maturation de protéines extralysosomales (Lecaille *et al.*, 2008). La découverte de l'expression spécifique de certaines cathepsines à cystéine et leur sécrétion sous forme active a élargi les recherches et ainsi changé l'opinion générale quant à leur importance physiologique. Nous savons maintenant qu'elles sont impliquées dans de nombreux processus physiologiques tels que la résorption osseuse, la présentation des antigènes associés aux molécules du complexe d'histocompatibilité (CMH) de classe II, l'homéostasie épidermique ou bien encore la maturation d'hormones et d'enzymes. En plus de ces fonctions, elles interviennent dans des processus physiopathologiques tels que l'arthrite rhumatoïde, l'ostéoporose, l'invasion tumorale, l'asthme et les phénomènes inflammatoires (Kasabova *et al.*, 2011; Vasiljeva *et al.*, 2007). Au vu de ces différentes implications physiopathologiques, la communauté scientifique ainsi que les entreprises pharmaceutiques s'intéressent de plus en plus à cette classe de protéases, en particulier comme cible thérapeutique. Il a été d'ores et déjà mis au point des inhibiteurs spécifiques des cathepsines qui sont en phase d'essai clinique.

2.1. Généralités

2.1.1. Classification et phylogénie

On distingue deux classifications principales pour les enzymes protéolytiques, la première (classique) découlant de l'« Enzyme Commission » (E.C.), et une seconde plus récente en clan et en famille proposée par Rawlings et Barrett (Rawlings *et al.*, 2004).

2.1.1.1. L'« Enzyme Commission »

Cette classification qui a pour origine la commission des enzymes de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (ou *IUBMB*) est basée sur la spécificité de substrat. Les protéases sont classées comme hydrolases selon cette classification (classe E.C.3) et en particulier E.C.3.4 puisqu'elles clivent les liaisons peptidiques. Ensuite il y a les sous-sous-classes, au nombre de 14, dépendantes de la nature des sites de clivage. De manière générale, on distingue les endopeptidases et les exopeptidases. Les endopeptidases clivent les liaisons peptidiques internes à la protéine libérant ainsi des peptides plus ou moins longs. En ce qui concerne les exopeptidases, le clivage se fait côté N-terminal (aminopeptidases) ou C-terminal (carboxypeptidases), ce qui libère soit des acides aminés libres, soit des dipeptides ou des tripeptides.

2.1.1.2. Classification en clans et en familles

La classification par l'E.C., bien qu'encore utilisée dans les bases de données par exemple, n'apporte aucune compréhension de l'évolution phylogénétique et fonctionnelle des enzymes. Pour pallier ce manque, une nouvelle classification a été mise en place sous forme de clans et de familles (Rawlings *et al.*, 2010). Cette classification répertorie les enzymes selon leur évolution à partir d'ancêtres communs. Une famille est un groupe d'enzymes qui possède, de manière statistique, une relation dans la séquence responsable de l'activité protéolytique. Cette relation statistique, ne tenant pas compte des insertions additionnelles non pertinentes d'un point de vue fonctionnel, permet d'établir l'appartenance de protéases à une même famille, ayant évoluées à partir d'un ancêtre commun, en accord avec la définition de l'homologie (Reeck *et al.*, 1987). Chaque famille est ainsi nommée par une lettre qui désigne son type catalytique puis d'un numéro attribué arbitrairement. La notion de clan rassemble les familles qui ont évolué à partir d'un ancêtre commun mais dont la véracité de cet ancêtre ne peut être vérifiée par comparaison des structures primaires du fait d'une divergence trop

ancienne. Ainsi la classification est faite selon la comparaison des structures tridimensionnelles, quand celles-ci sont disponibles, ou selon l'ordre des résidus catalytiques dans la séquence et des motifs communs conservés autour de cette séquence (Rawlings & Barrett, 1994). Les clans sont désignés de manière similaire aux familles avec une première lettre relative au type suivie d'une deuxième lettre arbitraire.

2.1.1.3. Le clan CA, famille C1 ou famille de la papaïne

Les protéases à cystéine sont réparties en 7 clans différents (clans CA, CD, CE, CF, CH, CL et C-) regroupant une cinquantaine de familles qui ont évolué depuis trois milliards d'années (Turk *et al.*, 2000). Parmi ces clans, celui de plus grande importance et représentant le plus grand nombre de protéases est le clan CA dont fait partie la famille C1 ou famille de la papaïne. A l'origine, le terme « super-famille de la papaïne » était utilisé pour regrouper différentes protéases de type cathepsine (L et B), bléomycine hydrolase et calpaïne (Berti & Storer, 1995). Au cours des années, après des études phylogénétiques et d'alignement de séquences plus poussées (Berti & Storer, 1995), il est finalement apparu trois groupes distincts : les protéases de type cathepsine et papaïne (famille C1a), les protéases de type bléomycine hydrolase (famille C1b) et celles du type calpaïne (famille C2) (Rawlings *et al.*, 2010).

Malgré leur origine commune, les différentes protéases de la famille C1a ont évolué en quatre groupes distincts. Le groupe de type cathepsine B a divergé très tôt dans l'évolution puis trois autres groupes sont apparus : le groupe des protéases végétales de type papaïne, des protéases de micro-organismes comme les trypanosomes et celui des enzymes de type cathepsine L (Wex *et al.*, 1999). En ce qui concerne les cathepsines à cystéine humaines, deux groupes principaux sont présents, différenciés selon la séquence de leur prorégion étant donné que les enzymes matures ne présentent que peu de différences, avec les cathepsines apparentées à la cathepsine L (L, K, S, H) et celles apparentées à la cathepsine B. Les cathepsines apparentées à la cathepsine L possèdent une prorégion d'une centaine de résidus avec deux motifs conservés ERF(X)NIN et GxNxFxD, tandis que la prorégion de la cathepsine B est plus courte (une soixantaine de résidus) et un seul motif est conservé : GxNxFxD (Berti & Storer, 1995; Karrer *et al.*, 1993). A côté de ces deux groupes principaux, on distingue les cathepsines F et W, qui possèdent une forme modifiée du motif ERF(X)NIN : ERFNAQ, et qui seraient proposées comme un autre sous-groupe, distinct des groupes L et B (Wex *et al.*, 1999).

2.1.2. Structures

Les cathepsines à cystéine sont synthétisées sous forme de préproenzymes. La prérégion qui correspond au peptide signal (15 à 20 résidus) est clivée suite à l'entrée dans la lumière du réticulum endoplasmique. La prorégion permet le bon repliement de l'enzyme, participe à sa stabilité et à des propriétés inhibitrices vis à vis du domaine catalytique. L'activation de l'enzyme a lieu par clivage et relargage de cette prorégion.

2.1.2.1. Domaine catalytique

Les formes matures des cathepsines à cystéine sont principalement monomériques, excepté la cathepsine C (également appelée DPPI) qui forme un tétramère, et leur masse moléculaire est comprise entre 20 et 30 kDa. Leur structure est composée de deux domaines de taille similaire, le domaine gauche ou L (pour *Left*) et le domaine droit ou R (pour *Right*) (Figure 2). Le domaine L, situé côté N-terminal, est constitué de trois hélices α dont la plus grande, d'une quarantaine de résidus, contient la cystéine du site catalytique. Ce domaine est stabilisé par deux ponts disulfures. Le domaine R, côté C-terminal, est quant à lui constitué de cinq ou six feuillets β formant un tonneau, stabilisé par un seul pont disulfure.

Au milieu de ces deux domaines se situe une cavité en forme de « V » où l'on retrouve le site actif avec ses résidus essentiels à l'activité protéolytique, le résidu Cys25 du domaine L et le résidu His159 du domaine R (suivant la numérotation de la papaïne) (McGrath *et al.*, 1995). Cette structuration générale rassemble toutes les cathepsines hormis les cathepsines B et X qui possèdent une boucle supplémentaire, appelée boucle d'occlusion ; et pour la cathepsine B, 4 ponts disulfures supplémentaires sont présents (Musil *et al.*, 1991).

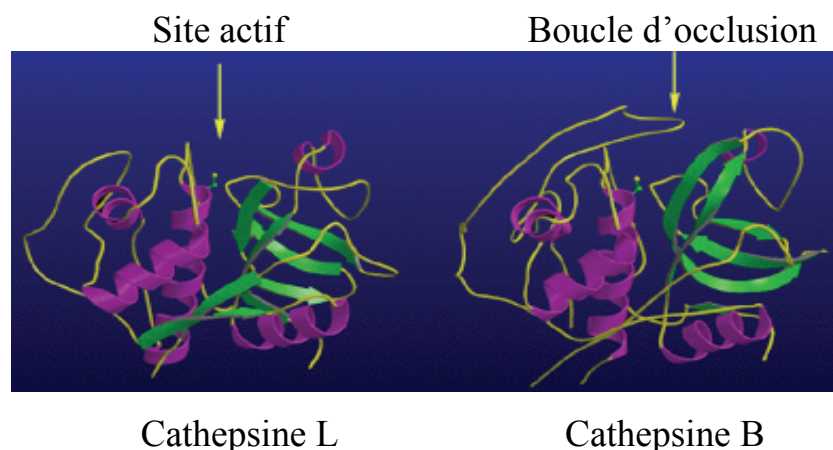


Figure 2 : Structures tridimensionnelles des cathepsines B et L
(D'après Coulombe *et al.*, 1996 ; Musil *et al.*, 1991)

2.1.2.2. Prorégion

Les prorégions des deux sous-familles, cathepsines de type B ou L, possèdent une similarité de repliement malgré une faible homologie de séquence (Cygler & Mort, 1997). Les prorégions des cathepsines de type L sont constituées de deux parties distinctes. Le fragment N-terminal, d'une longueur d'environ 60 résidus, forme un mini-domaine compact constitué de deux hélices α et d'un feuillet β étendu le long de la seconde hélice (Figure 3). Ce domaine est en contact avec une boucle positionnée à la surface de l'enzyme mature appelée PBL (pour *proregion binding loop*) correspondant aux résidus 140 à 154 selon la numérotation de la papaïne, qui stabilise la position de la prorégion. La partie C-terminale est étendue le long de la surface de l'enzyme, recouvrant le site actif où elle forme une courte hélice α . En ce qui concerne la cathepsine B, la prorégion est plus courte avec une partie C-terminale similaire à la cathepsine L. Cependant, elle diffère par un domaine N-terminal constitué uniquement d'une hélice α et d'un feuillet β . Cette différence n'interfère pas dans la stabilité de la prorégion de la cathepsine B, qui l'est par sa boucle d'occlusion en position ouverte. Une particularité distingue la cathepsine X des autres cathepsines, malgré une homologie avec la cathepsine L, car elle possède une prorégion très courte d'environ 38 résidus avec la présence d'un pont disulfure entre celle-ci et la cystéine du site actif (Sivaraman *et al.*, 2000).

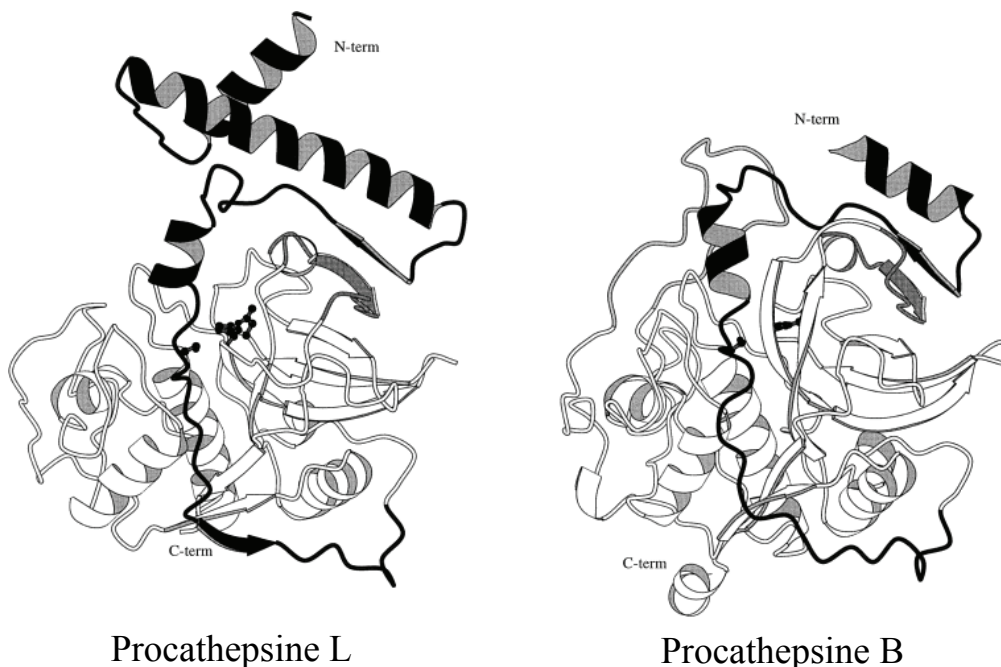


Figure 3 : Structures tridimensionnelles des procathepsines B et L

Les domaines catalytiques sont représentés en blanc et gris clair, et les prosegments sont représentés en gris foncé et noir. (D'après Cygler & Mort, 1997)

2.1.3. Fonctionnement et organisation du site catalytique

2.1.3.1. Mécanisme catalytique

Le mécanisme catalytique des cathepsines à cystéine comme leur nom l'indique est dépendant du résidu Cys25 ainsi que du résidu His159, qui permettent la formation d'une paire ionique thiolate-imidazolium (S-/ImH⁺) indispensable au processus catalytique. De plus, un troisième résidu est impliqué, Asn175, qui maintient la bonne orientation du résidu His159 via une liaison hydrogène (Storer & Ménard, 1994). Ainsi ces trois résidus forment la triade catalytique des cathepsines à cystéine. La première étape du mécanisme est l'attaque nucléophile, par le groupement thiol, du groupement carbonyle de la liaison peptidique. Il en résulte un intermédiaire tétraédrique anionique qui forme un oxyanion stabilisé par une liaison hydrogène entre la Cys25 et la Gln19 (Figure 4 A-C). Ensuite l'His159 perd son proton ce qui libère la partie amine du substrat (Figure 4 D) et entraîne l'arrivée d'une molécule d'eau permettant la formation d'un second intermédiaire acyl-enzyme (Figure 4 E). La dernière étape de déacylation permet la libération de la partie carbonyle du substrat hydrolysé (Figure 4 F) et l'enzyme redevient libre (Rzychon *et al.*, 2004; Storer & Ménard, 1994).

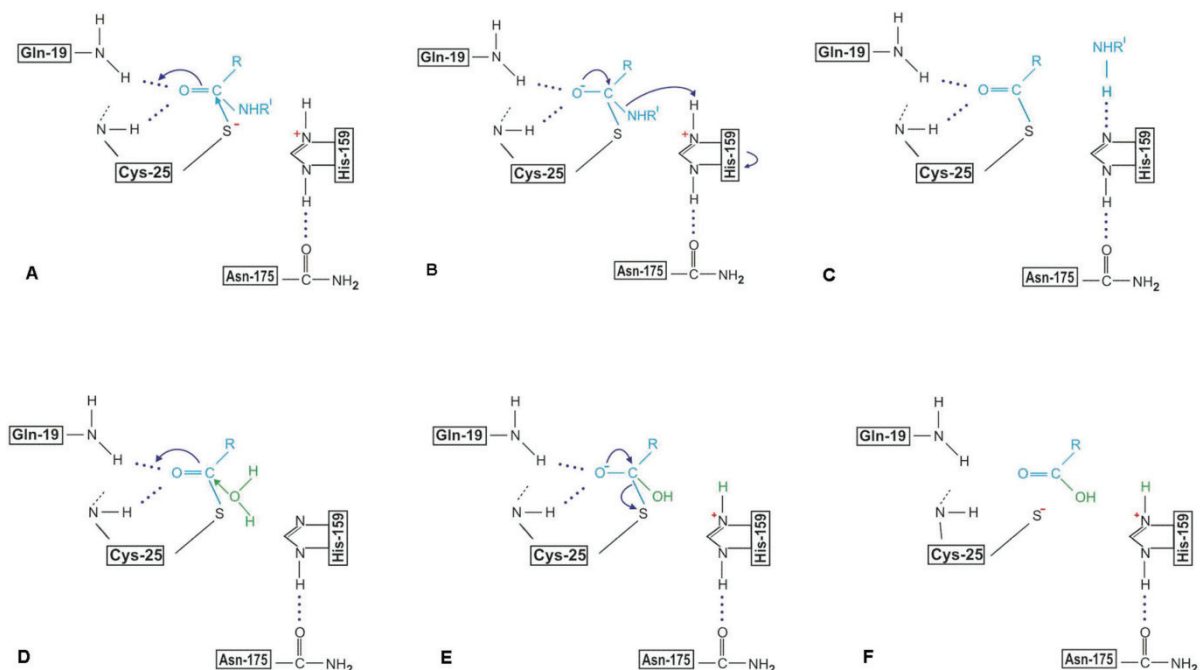


Figure 4 : Mécanisme catalytique des protéases à cystéine
(Rzychon *et al.*, 2004)

2.1.3.2. Sites de liaison au substrat

L'interaction entre les substrats polypeptidiques et le site actif des protéases est défini, selon la nomenclature de Schechter et Berger (Schechter & Berger, 1967), par une succession de sous-sites dans le site actif interagissant chacun avec un résidu du substrat. Les sous-sites dénommés S_n sont numérotés à partir du site de clivage, soit S_1 , S_2 ... en amont du site de clivage, et S'_1 , S'_2 ,... en aval. Il en va de même pour la numérotation des résidus du substrat précédée d'un P (Figure 5).

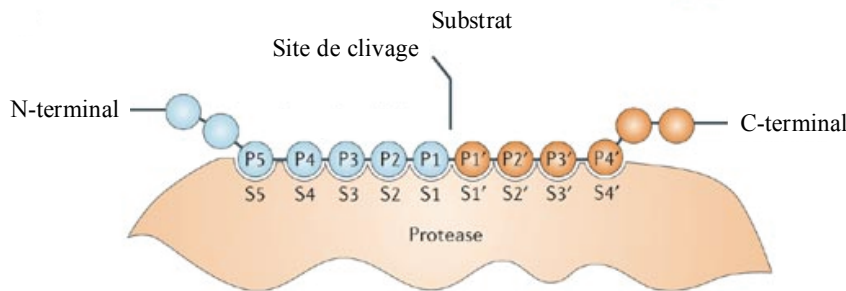


Figure 5 : Nomenclature de Schechter et Berger

Les positions S_5 à S_4' correspondent aux sous-sites du site actif de l'enzyme et P_5 à P_4' aux résidus du substrat. (D'après Schechter & Berger, 1967)

D'après les analyses structurales par cristallographie de complexes cathepsines-inhibiteurs analogues de substrats, les substrats se positionnent le long de la cavité, représentant le site actif de l'enzyme, et forment des liaisons alternées entre le domaine L et R. En ce qui concerne les sites de fixation, S_2 , S_1 et S'_1 sont bien définis chez les cathepsines avec un positionnement similaire quel que soit la cathepsine (McGrath, 1999; Turk & Guncar, 2003). Dans ces sites, on retrouve les résidus conservés Gly66, Gln29 et Trp177 (suivant la numérotation de la papaïne) qui interagissent avec les atomes du substrat, assurant ainsi le positionnement correct de celui-ci, nécessaire pour le clivage.

2.1.4. Particularités des exopeptidases

Les cathepsines à cystéine possèdent principalement une activité endopeptidasique mais quatre d'entre elles possèdent la particularité d'avoir une activité exopeptidasique : les cathepsines B, C, H et X. Cette particularité est due à la présence d'éléments structuraux supplémentaires qui limitent le nombre de sites de fixation aux substrats (Figure 6). Ces éléments empêchent la fixation de substrats peptidiques plus longs et ancrent les extrémités N- et C-terminales des substrats par des liaisons électrostatiques sélectives (Turk *et al.*, 2003). Pour la cathepsine B, cet élément, appelé boucle d'occlusion, est constitué de 20 résidus et

limite l'accès au site actif. Les propriétés catalytiques associées à cette boucle sont dépendantes de deux résidus histidine particuliers de la boucle : l'His110 et l'His111. Chez la cathepsine X, cette boucle ne fait que trois résidus, d'où son nom de mini-boucle, et ne possède qu'une seule histidine (Nägler *et al.*, 1999). La présence de cette mini-boucle encombre les sites après le sous-site S1, lui conférant une activité mono-carboxypeptidasique, tandis que pour la cathepsine B, ils le sont après le sous-site S2 ce qui lui confère une activité dipeptidyl carboxypeptidasique. En outre, la cathepsine B possède également une activité endopeptidasique, contrairement à la cathepsine X, car la boucle d'occlusion est mobile et peut ainsi dégager l'accès au site actif (Illy *et al.*, 1997; Nägler *et al.*, 1997; Podobnik *et al.*, 1997).

En ce qui concerne les cathepsines H et C, qui possèdent une activité aminopeptidasique, l'encombrement résulte d'un groupement carboxylique chargé négativement qui fixe la charge positive à l'extrémité N-terminale. Pour la cathepsine H, l'obstruction partielle est due à un peptide de huit résidus appartenant à la prorégion, appelé mini-chaîne, qui reste attaché au domaine catalytique (Vasiljeva *et al.*, 2003). Pour la cathepsine C, c'est l'existence d'un appendice, appelé domaine d'exclusion, qui engendre l'exclusion du substrat, mais il permet également l'assemblage spécifique en tétramère de la cathepsine C (Turk *et al.*, 2001a).

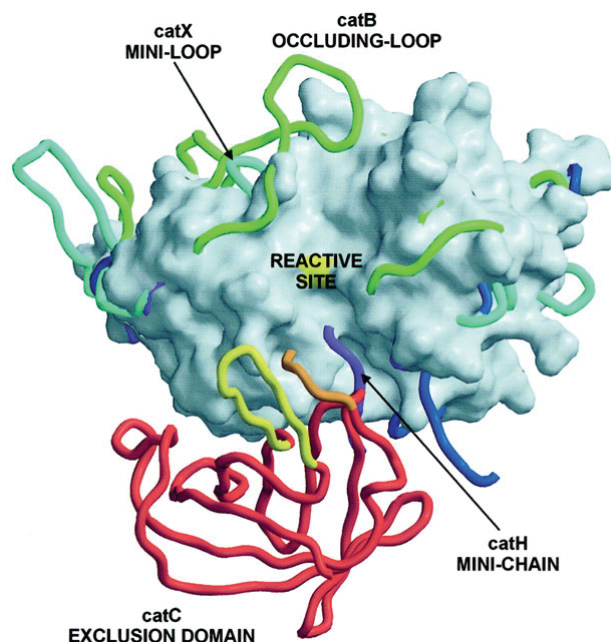


Figure 6 : Caractéristiques structurales des cathepsines ayant une activité exopeptidasique

Superposition du domaine catalytique de la cathepsine L avec les exo-domaines des cathepsines (cat) B (vert), C (rouge), H (violet) et X (turquoise). (D'après Turk *et al.*, 2001a)

2.1.5. Spécificité enzymatique des cathepsines à cystéine

La spécificité enzymatique des protéases est dépendante de la nature des résidus qui composent les sites d'interaction S et S' avec les résidus du substrat. Pour les cathepsines à cystéine, le sous-site S2 est le mieux caractérisé et il est le seul à représenter une « poche ». Il est constitué par des résidus des domaines gauche et droit, et il est le déterminant majeur de la spécificité des protéases à cystéine (McGrath, 1999). Pour la majorité des cathepsines, cette poche est hydrophobe et elle accepte préférentiellement une phénylalanine. Cependant il existe quelques variations dues à la présence de résidus spécifiques à certaines cathepsines comme pour les cathepsines B et K. La cathepsine B accepte des résidus basiques en S2, comme l'arginine, dû à la présence d'un acide glutamique en position 205 (Barrett & Kirschke, 1981) tandis que la cathepsine K accepte préférentiellement en S2 des petits résidus hydrophobes comme la leucine et la proline, dû aux résidus 67 et 205 (Lecaille *et al.*, 2002a, 2007a).

La spécificité des autres sous-sites est bien moins définie mais l'on sait que le sous-site S1, appartenant au domaine gauche, accepte préférentiellement des résidus basiques (lysine et arginine) (Brocklehurst *et al.*, 1987; Kirschke *et al.*, 1995). Il est à noter que la présence de la boucle d'occlusion de la cathepsine B limite l'accès au site S1 et ne permet l'accès qu'aux résidus peu encombrants (Kirschke *et al.*, 1988). Pour ce qui est du site S3, les résidus le constituant ne sont pas conservés chez les cathepsines et il ne semblerait pas y avoir de spécificité associée (Turk *et al.*, 1998). La spécificité des sous-sites S' est également peu définie à part pour le site S'2 qui accepte préférentiellement des résidus hydrophobes comme le tryptophane.

2.1.6. Localisation cellulaire des cathepsines

2.1.6.1. Voie d'adressage vers les lysosomes tardifs

Les cathepsines à cystéine sont synthétisées sous forme de préproenzymes au niveau du réticulum endoplasmique (RE) rugueux. La prérégion contient le peptide signal d'adressage à la lumière du RE où elle est clivée par les « signal peptidases ». Ensuite les procathepsines sont dirigées vers l'appareil de Golgi où elles vont subir différentes modifications de maturation comme la formation des ponts disulfures, les glycosylations et la phosphorylation du mannose (Brix *et al.*, 2008; Vernet *et al.*, 1990). Puis les proformes sont transportées via le récepteur du mannose-6-phosphate, vers les endosomes tardifs où elles sont maturées. La maturation nécessite le clivage et le relargage de la prorégion. Ce clivage va être réalisé par

des protéases présentes dans ces compartiments acides comme la pepsine ou la légumaine (Ishidoh & Kominami, 2002). Cependant, un autre mécanisme d'activation a également lieu via un auto-clivage de la prorégion selon un mécanisme intermoléculaire ou intramoléculaire. L'activation intermoléculaire fait intervenir une cathepsine déjà active qui va maturer ses procathepsines homologues (Mach *et al.*, 1994; Rowan *et al.*, 1992) tandis que l'activation intramoléculaire se fait par auto-catalyse, rendue possible par une conformation relâchée de la prorégion dans ce milieu acide permettant une activité faible mais suffisante pour ce clivage (Cygler & Mort, 1997; McQueney *et al.*, 1997).

2.1.6.2. Voies alternatives d'adressage

Malgré une localisation majoritaire dans les endosomes tardifs, des voies d'adressage parallèles sont mises en places dans certains types cellulaires pour que les cathepsines soient dirigées dans des compartiments différents et même sécrétées dans l'environnement extracellulaire. Dans certaines cellules épithéliales, comme les thyrocytes et les kératinocytes, les cathepsines sont ainsi redirigées des compartiments endosomaux / lysosomaux vers les faces apicales ou basales pour être sécrétées dans l'environnement extracellulaire sous forme active (Guinec *et al.*, 1993; Linke *et al.*, 2002). De manière similaire, les cathepsines peuvent être sécrétées par des cellules transformées au stade initial de formation de tumeurs (Rozhin *et al.*, 1994; Schlagenhauff *et al.*, 1992). De plus, un autre transport indépendant du mannose-6-phosphate est observé dans les cellules telles que les macrophages et les fibroblastes, dû à un défaut du récepteur mannose-6-phosphate ou l'absence du peptide signal de ce récepteur. Il en découle une sécrétion constitutive des cathepsines sous forme de zymogène via les voies de sécrétion classiques (pour revue : Brix *et al.*, 2008).

2.1.6.3. Les lysosomes sécrétoires

Les cellules d'origine hématopoïétique (cellules T, neutrophiles, mastocytes) possèdent des granules de sécrétion qui libèrent leur contenu quand elles ciblent une cellule ou neutralisent des infections bactériennes ou parasitaires. D'autres granules ont été identifiées pour être des lysosomes avec des marqueurs lysosomaux comme la protéine membranaire associée au lysosome (ou *lysosomal-associated membrane protein*, LAMP) ou des cathepsines. Dans les cellules hématopoïétiques matures, beaucoup de granules montrent un double marquage par des marqueurs lysosomaux et sécrétoires (Figure 7). Ces granules sont définis par le terme de « lysosomes sécrétoires » afin d'indiquer leur double fonctionnalité (Stinchcombe & Griffiths, 1999). Ainsi, il a été démontré que par cette voie les cellules NK (ou *Natural killer*) et les

mastocytes relarguent la cathepsine C, les macrophages quant à eux libérant les cathepsines B, L, S et K (Brown *et al.*, 1993; Punturieri *et al.*, 2000; Reddy *et al.*, 1995; Wolters *et al.*, 1998). La sécrétion de cathepsines à cystéine via les lysosomes sécrétoires ne semble pas être limitée aux cellules de la lignée hématopoïétique, ainsi des cellules de muscle lisse sont capables de synthétiser et de sécréter la cathepsine S après stimulation par l'interféron- γ (IFN- γ) (Shi *et al.*, 1999a). De la même façon, l'activation des fibroblastes par des ionophores calciques cause la libération de la β -hexoaminidase lysosomale (Rodríguez *et al.*, 1997). Ces dernières études indiquent que la présence de lysosomes sécrétoires est une caractéristique de nombreuses cellules et représenterait un mode primitif de sécrétion pour ces cellules.

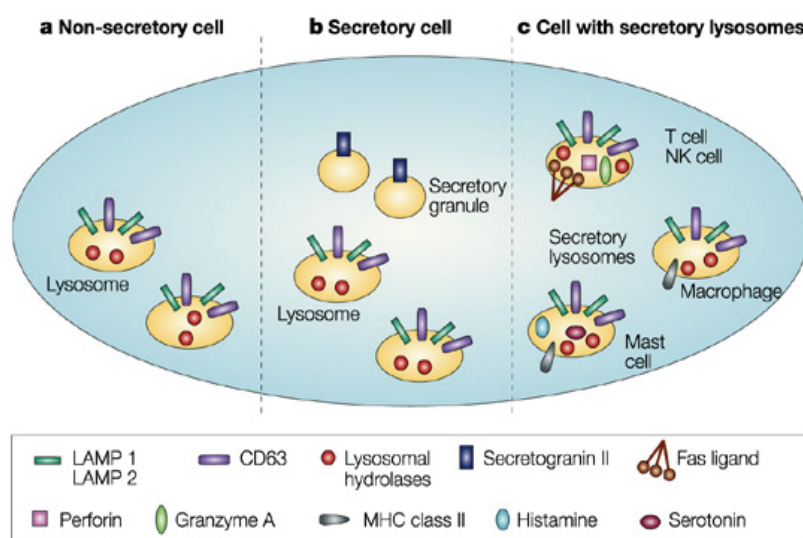


Figure 7 : Marqueurs caractéristiques des lysosomes conventionnels, des granules de sécrétion et des lysosomes sécrétoires

Les lysosomes de sécrétion (c) contiennent des marqueurs communs aux lysosomes conventionnels (a) et aux granules de sécrétion (b) ainsi que des marqueurs qui leur sont propres. Par exemple, le ligand Fas et la granzyme A sont retrouvés spécifiquement dans les lysosomes sécrétoires des cellules T et NK (*natural killer*), le CMH de classe II dans ceux des macrophages et l'histamine dans ceux des mastocytes (*mast cell*). (Blott & Griffiths, 2002)

2.2. Régulation des cathepsines à cystéine

2.2.1. Inhibition par la prorégion

2.2.1.1. Mode d'inhibition

Le mode d'inhibition de la prorégion est similaire pour la majorité des cathepsines et il correspond à un encombrement stérique limitant l'accès au site actif. La prorégion est liée de manière covalente à l'enzyme par son extrémité C-terminale et du côté N-terminal, elle forme un domaine en épingle à cheveux qui interagit avec la boucle PBL (Cyglér & Mort, 1997;

Turk, 2006). Entre les deux, elle adopte une conformation étendue à l'interface des deux domaines L et R jusqu'au site actif, où elle forme une courte hélice α de deux tours qui se positionne au niveau des sites d'interaction au substrat, S et S' (Coulombe *et al.*, 1996). Malgré une interaction similaire à celle du substrat, la différence majeure est que la prorégion se positionne dans la direction opposée. Cependant, les chaînes légères de la prorégion utilisent les mêmes sous-sites à la surface de l'enzyme que les substrats et ceci est particulièrement le cas au niveau du sous-site S2, où l'on retrouve un résidu comparable au substrat comme la leucine ou une phénylalanine. La résistance au clivage de la prorégion, malgré sa position sur la machinerie catalytique, s'explique par la direction inverse de la chaîne polypeptidique qui lui confère un positionnement inapproprié pour que le clivage se produise.

2.2.1.2. Spécificité de l'inhibition par la prorégion

De nombreuses études sur les protéases à cystéine révèlent que des peptides synthétiques correspondant aux prorégions représentent de bons inhibiteurs vis-à-vis de leurs enzymes parentales. Ainsi, le propeptide issu de la procathepsine B inhibe de manière réversible son enzyme parentale ($K_i = 0,4 \text{ nM}$), tandis qu'il inhibe peu la cathepsine L et la papaïne quel que soit le pH (Fox *et al.*, 1992). De manière similaire, la cathepsine L est inhibée spécifiquement et sélectivement par un peptide synthétique constitué de 87 résidus sur les 96 de sa prorégion ($K_i = 0,088 \text{ nM}$) (Carmona *et al.*, 1996) (Figure 8).

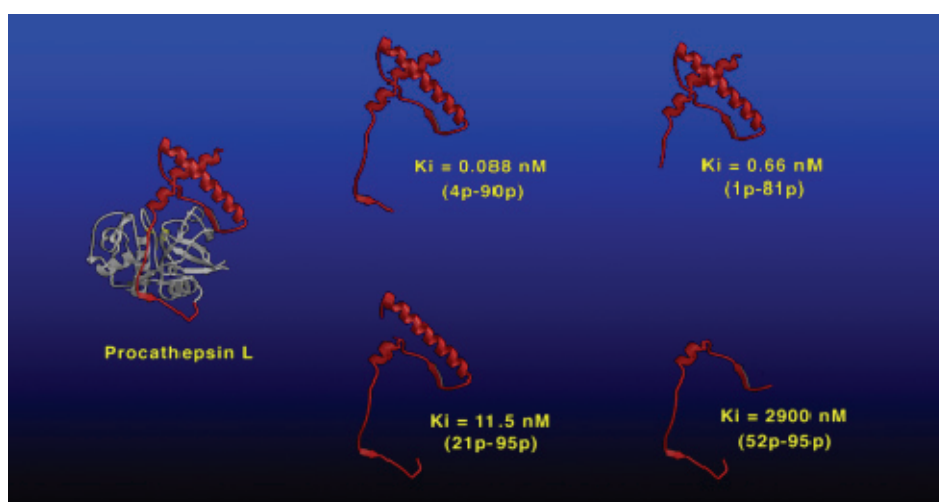


Figure 8 : Inhibition de la cathepsine L par des peptides recombinants dérivés de la prorégion

Structure tridimensionnelle de la procathepsine L (domaine catalytique en gris, prorégion en rouge) (D'après Coulombe *et al.*, 1996). La prorégion est constituée de 95 résidus (numérotée 1p-95p). Les peptides tronqués dérivés de la prorégion sont représentés avec leur constante d'inhibition (K_i) respective. (D'après Carmona *et al.*, 1996)

Cette inhibition sélective par les pro-peptides se retrouve également pour des protéases à cystéine végétales proches, comme la papaïne ou bien la chymopapaïne, et des protéases parasitaires (Godat *et al.*, 2005; Lalmanach *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 1995). Au vu des différences d'interaction selon l'origine du propeptide et la cathepsine visée, il semblerait que deux zones d'interaction soient responsables de la spécificité d'inhibition des prorégions par rapport à leurs enzymes matures : la première étant la zone d'interaction avec les sites de fixation au substrat, et la seconde correspondant à l'interaction entre le domaine en épingle à cheveux et la boucle PBL de l'enzyme.

2.2.2. Inhibiteurs naturels spécifiques : Superfamille des cystatines

Les inhibiteurs endogènes naturels des protéases à cystéine les plus étudiés appartiennent à la superfamille des cystatines. Ils sont présents chez les mammifères, les oiseaux, les insectes, les plantes, les protozoaires et même chez les virus. Ce sont des inhibiteurs compétitifs, réversibles qui possèdent des similarités structurales et fonctionnelles, agissant dans les compartiments intracellulaires ainsi que dans l'environnement extracellulaire. D'après leur homologie de séquence, les membres de cette superfamille sont classés en trois familles : les stéfinines (type 1), les cystatines (type 2) et les kininogènes (type 3) (Barrett, 1986). A l'heure actuelle, la classification de la superfamille par « type » est toujours largement utilisée bien que la classification en clan et famille, comme pour les protéases, soit maintenant disponible sur la banque de donnée MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/>) (Rawlings *et al.*, 2004).

2.2.2.1. Les stéfinines (type 1)

Parmi les trois types, les stéfinines sont les plus simples structurellement avec une chaîne polypeptidique unique d'environ 11 kDa, sans pont disulfure ni site de glycosylation. Bien qu'elles soient principalement intracellulaires, elles peuvent être trouvées dans les fluides biologiques (Abrahamson *et al.*, 1986). Chez l'homme, deux stéfinines constituées de 98 résidus sont présentes : les stéfinines A et B. La stéfine A est exprimée de manière importante dans les cellules épithéliales de la peau, tandis que l'expression de la stéfine B est plus large avec une localisation cytoplasmique. Par ailleurs, la localisation cytoplasmique de la stéfine B suggère qu'elle protégerait les cellules lors de la libération des cathepsines lysosomales.

2.2.2.2. Les cystatines (type 2)

Les cystatines, comme les stéfinines, sont constituées d'une chaîne polypeptidique mais d'une longueur plus importante, environ 115 résidus (12 kDa), et possèdent deux ponts disulfures.

Les plus connues et étudiées sont la cystatine C et la cystatine de poulet, cette dernière représentant jusqu'à 20 % des protéines du blanc d'œuf (Anastasi *et al.*, 1983). Chez l'homme, on distingue huit cystatines : les cystatines C, D, E/M, F, G, S, SA et SN. La cystatine F possède la particularité d'avoir un troisième pont disulfure stabilisant sa structure et d'être synthétisée et sécrétée sous la forme d'un précurseur dimérique. De plus, elle est glycosylée comme les cystatines E/M et S. Outre leur localisation cytoplasmique, les cystatines sont également présentes dans de nombreux fluides biologiques tels que le plasma séminal, le liquide cébrospinal, le lait, le plasma, le sang, la salive ou bien encore les urines (Popovic *et al.*, 1999; Turk & Bode, 1991). En effet, contrairement aux stéfines, les cystatines possèdent une séquence signal pour être sécrétées dans l'environnement extracellulaire.

2.2.2.3. Les kininogènes (type 3)

Les kininogènes sont à l'origine connus comme étant les précurseurs des kinines. Par la suite, ces glycoprotéines, présentes dans le plasma et divers liquides biologiques, ont été identifiées comme étant des inhibiteurs de cathepsines à cystéine. Leur identification en tant qu'inhibiteur fut faite auparavant mais ils étaient nommés inhibiteurs de protéases à cystéine α (ou α -CPI pour *α -cysteine proteinase inhibitors*) (Barrett, 1986). Il existe chez l'homme deux types de kininogène : le kininogène de haut poids moléculaire (ou *high molecular weight kininogen*, HMWK) avec une masse apparente de 90-115 kDa et le kininogène de bas poids moléculaire (ou *low molecular weight kininogen*, LMWK) avec une masse de 50-70 kDa (Salvesen *et al.*, 1986). Chez le rat, un troisième type de kininogène existe : le T-kininogène (ou thiostatine) de 68 kDa (Esnard & Gauthier, 1983). Les kininogènes humains sont constitués de deux chaînes de part et d'autre du domaine d'insertion de la bradykinine (domaine 4) (Figure 9).

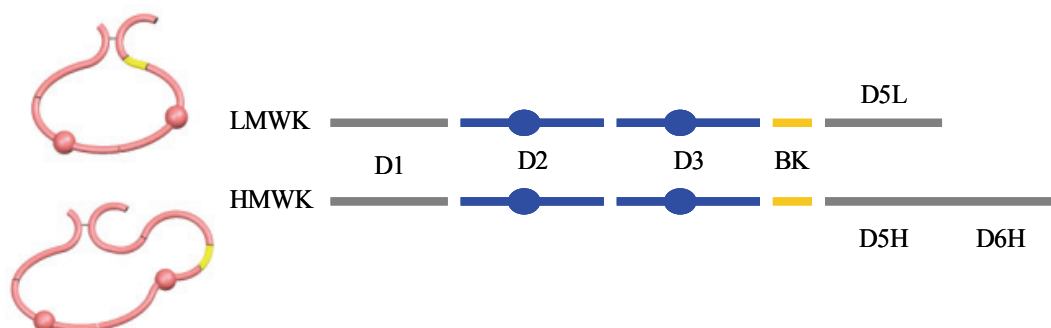


Figure 9 : Structures schématiques des kininogènes organisées en domaines

Chaîne lourde : Domaines D1, D2 et D3. D2 et D3 : domaines inhibiteurs des cathepsines à cystéine. D4 : Bradykinine. Chaîne légère : Domaines D5 et D6.

La chaîne lourde, côté N-terminal, est constituée de trois domaines de type cystatine (D1 à D3) dont seuls deux domaines sont inhibiteurs (D2 et D3). Cette chaîne lourde est identique pour les deux types de kininogène. La chaîne légère, côté C-terminal, est quant à elle constituée de deux domaines pour le HMWK (D5 et D6) et d'un domaine court D5 pour le LMWK (Müller-Esterl, 1987). Les kininogènes sont de très bons inhibiteurs des cathepsines à cystéine, mis à part la cathepsine B qui, en plus d'être mal inhibée (K_i de l'ordre du micromolaire), semble être capable de cliver les kininogènes dans des conditions physiopathologiques (Barros *et al.*, 2004).

2.2.2.4. Interactions cystatine / protéases à cystéine

Les cystatines inhibent réversiblement les protéases à cystéine avec la formation d'un complexe stable selon une stoechiométrie de type 1:1 (enzyme:inhibiteur) alors que les kininogènes sont capables d'inhiber deux protéases de manière indépendante (Green *et al.*, 1984; Moreau *et al.*, 1986; Salvesen *et al.*, 1986). Le mécanisme général d'inhibition de la superfamille a été élucidé à l'aide des structures tridimensionnelles de la cystatine de poulet et de la stéfine B humaine complexées à la papaïne, et fait intervenir trois régions hautement conservées (Figure 10) (pour revue : Bode & Huber, 1992) : i/ une première région amino-terminale dite « substrat-like » contenant une glycine invariante dans une séquence consensus « LVG » (Abrahamson *et al.*, 1987; Grubb *et al.*, 1990; Machleidt *et al.*, 1989) ; ii/ une région centrale pentapeptidique avec une séquence consensus de type QVVAG hautement conservée dans les trois familles, qui stabilise le complexe inhibiteur-enzyme (Bode *et al.*, 1990; Stubbs *et al.*, 1990) ; iii/ une région carboxy-terminale possédant un doublet de type PW (Björk & Ylinenjärvi, 1990).



Figure 10 : Localisation des trois régions constituant le site inhibiteur de la superfamille des cystatines

Modélisation du domaine D2 des kininogènes humains réalisée par Shafinaz Chowdhury (Montréal, Canada).

2.2.3. Inhibiteurs naturels non spécifiques des cathepsines

Cette classe d'inhibiteurs correspond principalement aux α -macroglobulines capables d'inhiber les différentes classes de protéases. Les α -globulines, dont l' α_2 -macroglobuline humaine (α -2M), sont constituées de quatre sous-unités identiques de 185000 Da (Hudson & Koo, 1982). Elles sont synthétisées dans le foie et sont abondantes dans le plasma et les liquides interstitiels. Il semble que ces inhibiteurs interviennent dans la modulation de l'activité protéolytique de nombreuses classes de protéases lors de processus inflammatoires (Ellis *et al.*, 1982).

2.2.4. Autres inhibiteurs endogènes

2.2.4.1. La famille de la thyrope

La famille de la thyrope rassemble de nombreuses protéines qui possèdent dans leur séquence un motif riche en cystéine issu du domaine de type 1 de la thyroglobuline humaine (Lenarcic & Turk, 1999). Ce domaine est retrouvé chez de nombreuses protéines aux fonctionnalités diverses, chez l'homme comme d'autres organismes, et certaines d'entre elles présentent des activités inhibitrices contre les protéases acides ou les métalloprotéases (Molina *et al.*, 1996). Certains membres de cette famille présentent une activité inhibitrice spécifique vis-à-vis des cathepsines à cystéine comme l'équistatine, isolée de l'anémone de mer, et le fragment p41, dérivé de la chaîne invariante Ii du CMH de classe II (Lenarcic *et al.*, 1997; Stoka *et al.*, 1999).

2.2.4.2. Les serpins

Les serpins sont d'abord et essentiellement des inhibiteurs de protéases à sérine mais certaines d'entre elles peuvent également inhiber des protéases de la famille de la papaïne. Ainsi, la protéine humaine SCCA 1 (ou *squamous cell carcinoma antigen 1*) est capable d'inhiber les cathepsines K, L et S (Schick *et al.*, 1998), et SQN-5, sa protéine orthologue murine, inhibe en plus la cathepsine V (Al-Khunaizi *et al.*, 2002). A côté de celles-ci, il y a l'hurpine et la serpine endopine 2C qui inhibent de manière sélective la cathepsine L (Hwang *et al.*, 2005; Welss *et al.*, 2003).

2.2.5. Régulation par le pH, les glycosaminoglycanes et le stress oxydatif

2.2.5.1. Régulation par le pH

Les protéases à cystéine de la famille de la papaïne furent longtemps considérées comme instables à pH neutre, suggérant que c'était le mécanisme principal de contrôle des cathepsines s'échappant des lysosomes. Par la suite, la mise en évidence de cathepsines actives dans d'autres compartiments cellulaires ainsi que dans l'environnement extracellulaire, a engendré un changement de point de vue dans le monde scientifique. Il est maintenant établi que certaines cathepsines, en particulier la cathepsine S, sont stables à pH neutre, tandis que d'autres sont rapidement inactivées. Cependant, de nombreux mécanismes moléculaires et cellulaires permettent entre autre d'augmenter la stabilité des cathepsines à pH neutre ou bien encore d'acidifier l'environnement extracellulaire, permettant aux cathepsines d'agir en dehors des lysosomes.

La force ionique a par exemple été mise en avant avec une étude *in vitro* qui montre que celle-ci a une influence directe sur l'activité de la cathepsine L, avec une modification de sa stabilité et de ses constantes cinétiques (Dehrmann *et al.*, 1996). Ainsi, la cathepsine L peut avoir son maximum d'activité pour des valeurs de pH d'environ 7, et non à pH 5-6 (Dehrmann *et al.*, 1995). Les mêmes résultats sont obtenus en solution saline de Hank (pH 7,4) (ou *Hank's balanced salt solution*, HBSS), qui est considérée comme un modèle pertinent de fluide biologique.

Pour expliquer l'activité extracellulaire des cathepsines à cystéine, l'acidification de l'environnement extracellulaire par certains types de cellules a également été mise en évidence. Par exemple, une étude *in vitro* montre que les macrophages acidifient l'environnement péricellulaire en utilisant des vacuoles de type H⁺-ATPase, qui pompent les protons du cytoplasme vers l'espace extracellulaire. Et parallèlement à cela, ils sécrètent les cathepsines L, S et K qui vont dégrader l'élastine (Punturieri *et al.*, 2000). De manière similaire, les ostéoclastes, responsables de la dégradation et du remodelage du collagène du tissu osseux, sécrètent la cathepsine K dans un environnement confiné appelé lacuna. L'activité de la cathepsine K est alors favorisée par la sécrétion de protons qui vont engendrer un pH acide (pour revue : Lecaille *et al.*, 2008). De même, l'environnement des cellules tumorales est connu pour être acidifié grâce à la présence de canaux ioniques, favorisant l'activité protéolytique des cathepsines (Gillet *et al.*, 2009).

2.2.5.2. Les glycosaminoglycanes

Un des mécanismes participant à la stabilité des cathepsines à pH neutre ou modulant leur activité est l'interaction de celles-ci avec différentes molécules et en particulier les glycosaminoglycanes. Les glycosaminoglycanes (ou GAG) sont des hétéropolysaccharides chargés négativement qui interagissent avec de nombreuses protéines au niveau de la surface cellulaire (pour revue : Gandhi & Mancera, 2008). De nombreux GAG sont capables d'interagir avec les cathepsines à cystéine, comme l'héparine, l'héparane sulfate, le sulfate de dextran ou les chondroïtines sulfates, et les effets associés sont multiples. Par exemple, ils facilitent la maturation des cathepsines, comme l'auto-activation de la cathepsine B, en modifiant la conformation de la prorégion (Caglic *et al.*, 2007). De la même façon, l'auto-activation de la procathepsine S à pH neutre est multipliée par vingt en présence de GAG (Vasiljeva *et al.*, 2005). De plus, il a été montré qu'en présence d'héparane sulfate et d'héparine, l'activité endopeptidasique de la cathepsine B est potentialisée et sa stabilité est augmentée à pH neutre (Almeida *et al.*, 2001). Une étude récente de modélisation moléculaire suggère que cette stabilisation par l'héparine passerait par la diminution de la flexibilité structurale de la cathepsine B (Costa *et al.*, 2010). Cependant, l'interaction de ces mêmes GAG, héparane sulfate et héparine, avec la cathepsine K entraîne une inhibition de son activité collagénolytique, tandis qu'en présence de chondroïtine 4-sulfate, cette activité est augmentée (Cherney *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2004). En plus des GAG, il est à noter que l'interaction réversible des cathepsines avec leurs inhibiteurs naturels (cystatines, kininogènes) entraîne également une protection partielle contre l'inactivation par le pH, comme le fait la prorégion avant maturation.

2.2.5.3. Le stress oxydatif

De nombreuses espèces réactives de l'oxygène, comme le peroxyde d'hydrogène, le radical superoxyde ou bien encore l'oxyde nitrique, sont présentes dans le milieu extracellulaire en conditions physiologiques mais également physiopathologiques, et celles-ci sont capables de moduler l'activité des cathepsines à cystéine. En effet, les protéases à cystéine sont sensibles aux agents oxydants (Ascenzi *et al.*, 2001) et en particulier la cystéine du site actif (Giles *et al.*, 2002). Ainsi, une étude de l'effet du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), sur la cathepsine K révèle que l'H₂O₂, marqueur du stress oxydatif, inhibe l'auto-maturation de la cathepsine K et inactive sa forme mature (Godat *et al.*, 2008). Cependant, cette inactivation est en partie réversible après addition de catalase et d'un agent réducteur, le dithiothréitol (DTT). Ceci est dû à une oxydation des cystéines du site actif sous forme sulfénique et non pas sous forme

sulfinique ou sulfonique. Cette inactivation réversible pourrait partiellement expliquer le maintien de l'activité des cathepsines à cystéine pendant les phénomènes inflammatoires. De plus, il a été montré que la catalase pourrait participer à la préservation de l'activité protéolytique des cathepsines à cystéine dans le milieu extracellulaire dans un contexte de stress oxydatif (Hervé-Grépinet *et al.*, 2008). En effet, l'étude, réalisée sur une lignée monocyttaire, révèle que la catalase sécrétée de manière constitutive protège l'inactivation des cathepsines par l'H₂O₂.

2.2.6. Inhibiteurs synthétiques

Les inhibiteurs synthétiques des protéases à cystéine comprennent une large gamme de peptides dérivés d'aldéhydes et de nitriles agissant comme des inhibiteurs réversibles ainsi que des diazométhanes, des dérivés époxy, des halométhyl-cétones ou bien encore des vinyl-sulfones agissant comme des inhibiteurs irréversibles. Si à l'origine les inhibiteurs de protéases ont servi à la compréhension des mécanismes de l'activité protéolytique, ils sont maintenant envisagés et développés dans le cadre de traitements thérapeutiques.

2.2.6.1. Inhibiteurs réversibles

Les premiers inhibiteurs réversibles décrits sont les peptides aldéhydes extraits de souches de *Streptomyces* comme la leupeptine, la chymostatine et l'antipaïne. Cependant ces inhibiteurs ne sont que peu sélectifs des protéases à cystéine (Rich *et al.*, 1986). Ainsi, d'autres inhibiteurs analogues ont été développés par la suite afin d'améliorer la sélectivité (Shaw, 1990). Ces inhibiteurs sont des analogues de l'état de transition et leur utilisation a permis d'étudier le mécanisme catalytique des protéases à cystéine (Dufour *et al.*, 1995). Outre ces peptides aldéhydes, il existe d'autres types d'inhibiteurs réversibles dont les peptidyl céto-ester amides (ou acides), les peptidyl (acyloxy)méthanés qui présentent des réactivités différentes vis-à-vis des cathepsines B, L et S, et les peptides de type diacyl hydroxamate (Brömme *et al.*, 1994; Hu & Abeles, 1990; Krantz, 1994).

2.2.6.2. Inhibiteurs irréversibles

Les premiers inhibiteurs irréversibles synthétisés ont été des peptidyl-chloro-méthyl cétones (Shaw, 1990). Malheureusement, du fait de leur très grande réactivité, ils inhibent les protéases à sérine ou se fixent à des molécules possédant une fonction -SH libre comme le glutathion ou des enzymes non protéolytiques. Afin de pallier ces difficultés, des dérivés de type fluoro-méthyl cétone ont été synthétisés en remplaçant le groupement chlore par un

fluore. Ces dérivés fluorés ont permis l'étude des protéases à cystéine avec une sélectivité satisfaisante entre les différentes cathepsines (Harth *et al.*, 1993; Shaw, 1990).

En plus de ces mises au point d'inhibiteurs issus de la synthèse organique, un inhibiteur a été isolé à partir d'un extrait de culture d'*Aspergillus japonicus* : le 1-N-(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl) L-leucyl amino-4-guanidinobutane ou E-64 (Barrett *et al.*, 1981). Cet inhibiteur est irréversible et inhibe spécifiquement les protéases à cystéine par alkylation de la cystéine du site actif de l'enzyme (Figure 11). Il agit de façon dose-dépendante et sert comme agent titrant des protéases de la famille de la papaïne (Barrett *et al.*, 1982). Au niveau des sites d'interaction, le résidu époxy interagit avec le site S1 et le résidu leucine est ancré dans le site S2. A partir de cet inhibiteur, plusieurs dérivés ont été développés afin d'améliorer la sélectivité vis-à-vis des différentes protéases, tel que les CLIK (pour *cathepsin L inhibitors* Katunuma) ou les CA-030 et CA-074, des inhibiteurs spécifiques de la cathepsine B (Katunuma *et al.*, 1999).

Bien que les différentes classes d'inhibiteurs présentés précédemment soient de bons outils biochimiques, ils posent un problème de toxicité pour les organismes. C'est pourquoi les vinyl-sulfones, une nouvelle classe d'inhibiteurs, semblent prometteurs (Palmer *et al.*, 1995). Ils possèdent une sélectivité importante et ne présentent pas d'effets secondaires nocifs apparents (Brömme *et al.*, 1996a). Ces inhibiteurs, construits sur la base d'un groupement réactif de vinyl sulfone, se positionnent de part et d'autre du site actif qu'ils bloquent par l'interaction d'une liaison pseudo-peptidique non hydrolysable (Thompson *et al.*, 1997).

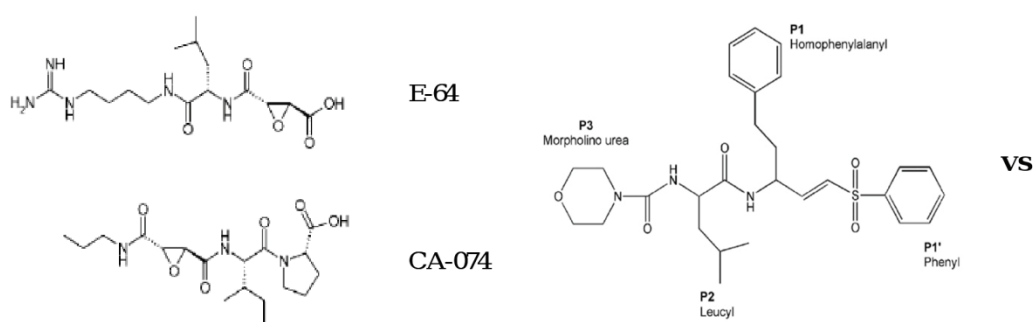


Figure 11 : Structures du E-64, du CA-074 et d'un vinyl-sulfone (VS, Mu-Leu-Hph-VSPh)

E-64 : 1-N-(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl) L-leucyl amino-4-guanidinobutane (inhibiteur commun aux cathepsines). CA-074 : N-(L-3-trans-propylcarbomoyl-oxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline (inhibiteur spécifique de la cathepsine B). VS : morpholine urea-Leu-homophénylalanine-(vinylsulfonyl)benzène (Mu-Leu-Hph-VSPh) (inhibiteur de la cathepsine S).

2.3. Fonctions physiologiques et physiopathologiques des cathepsines à cystéine

2.3.1. Fonctions physiologiques

A l'origine, les cathepsines à cystéine étaient connues pour leur implication dans la dégradation et le recyclage des protéines dans les compartiments endosomaux et lysosomaux (Barrett, 1992). Cependant, il est maintenant bien établi que ces protéases possèdent des fonctions plus spécifiques que ce soit dans les compartiments intra- ou extracellulaires (Turk *et al.*, 2001b). Ainsi, elles sont impliquées dans l'activation de précurseurs protéiques (proenzymes et prohormones), la présentation des antigènes par le CMH de classe II, l'apoptose mais également le remodelage osseux, la différenciation des kératinocytes, le cycle capillaire ou la reproduction.

2.3.1.1. Activation des précurseurs protéiques

Les cathepsines à cystéine sont impliquées dans la maturation de nombreuses protéines aux fonctionnalités variées. Ainsi les cathepsines B, L et K participent à la formation d'hormones comme la thyroxine, une hormone thyroïdienne, après protéolyse de la thyroglobuline (Brix *et al.*, 1996; Friedrichs *et al.*, 2003). Elles participent également à l'activation de neurotransmetteurs au niveau cérébral. En effet, la cathepsine L est retrouvée dans les vésicules de sécrétion neuronales, où elle semble être la principale protéase responsable de la libération de peptides neurotransmetteurs comme l'encéphaline, à partir de leurs précurseurs protéiques (Hook *et al.*, 2004; Yasothornsrikul *et al.*, 2003). De plus, les cathepsines B et C participent à la maturation de proenzymes. Une étude sur des souches de fibroblastes, utilisant l'inhibiteur spécifique de la cathepsine B, le CA-074, a mis en évidence que cette cathepsine mature la β -galactosidase (Okamura-Oho *et al.*, 1997). Elle serait également impliquée dans la maturation de la rénine (Jutras & Reudelhuber, 1999) et, avec la cathepsine L, de la β -tryptase (Le *et al.*, 2011). En ce qui concerne la cathepsine C, elle active de nombreuses protéases et en particulier des protéases à sérine comme les granzymes et l'élastase (Adkison *et al.*, 2002; Pham & Ley, 1999).

2.3.1.2. Présentation antigénique

La présentation d'antigènes par le CMH de classe II joue un rôle central dans la réponse immunitaire adaptative. Les cathepsines à cystéine sont impliquées dans ce processus, et en particulier, dans la génération des peptides antigéniques présentés et dans la formation du

CMH lui-même (Figure 12). Les études de dégradation *in vitro* des antigènes ont révélé que les cathepsines à cystéine participent à leur dégradation et à la génération de peptides avec l'aide d'autres protéases lysosomales (comme la cathepsine D ou la légumaïne) (Katunuma *et al.*, 1998). Cependant, les différentes souris transgéniques déficientes en une cathepsine ne montrent pas un défaut de génération d'antigènes, suggérant une fonction redondante des différentes cathepsines pour la génération de peptides pour le CMH de classe II (Deussing *et al.*, 1998).

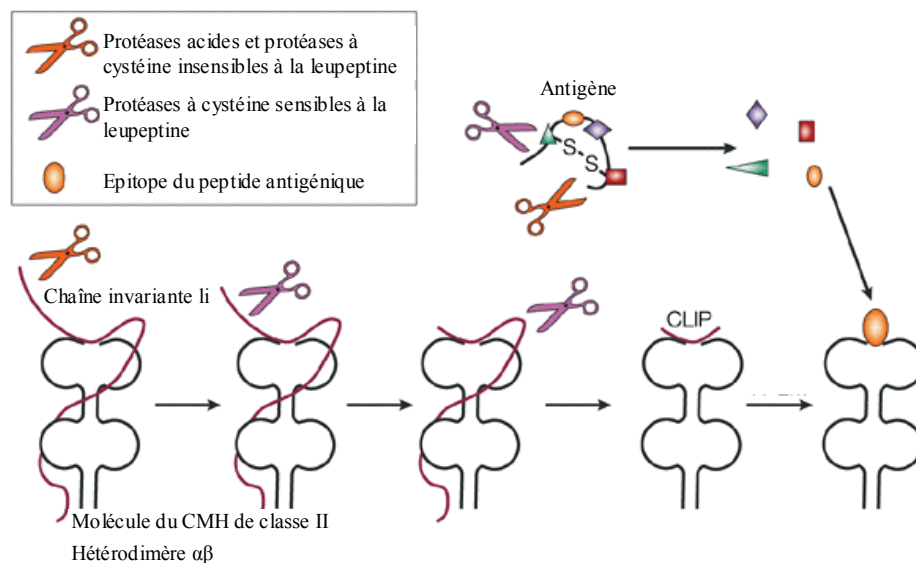


Figure 12 : Rôle des protéases à cystéine dans la présentation des antigènes par le CMH de classe II

Les cathepsines à cystéine participent à la génération des peptides antigéniques et à la maturation de la chaîne invariante Ii, qui stabilise l'hétérodimère du CMH, en peptide CLIP (*class II-associated invariant chain peptide*). (D'après Honey & Rudensky, 2003)

D'autre part, les cathepsines à cystéine sont impliquées dans la maturation de la chaîne invariante Ii du CMH de classe II. La chaîne invariante Ii, de 31 kDa, se lie aux molécules α et β formant l'hétérodimère du CMH de classe II, et stabilise ainsi le complexe et permet son transport vers les compartiments lysosomaux. La zone de contact entre Ii et le complexe CMH est un peptide d'environ 15 résidus appelé CLIP (pour *class II-associated invariant chain peptide*), qui sera remplacé par le peptide antigénique pour la présentation à la surface de la cellule. La génération du peptide CLIP a lieu après deux clivages successifs, et les études *in vitro* et *in vivo* montrent que les cathepsines à cystéine sont impliquées dans le deuxième clivage générant le peptide CLIP. La première cathepsine mise en évidence dans ce processus fut la cathepsine S grâce à l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de type vinyl-sulfone, bloquant la maturation de la chaîne Ii au niveau des lymphocytes B et des cellules

dendritiques (Nakagawa *et al.*, 1999; Riese *et al.*, 1996). Cependant, l'utilisation des souris déficientes en cathepsines a démontré que cette cathepsine n'était pas responsable de la génération de CLIP dans toutes les cellules présentatrices d'antigènes. Ainsi, la cathepsine L intervient dans la maturation de CLIP dans les cellules épithéliales corticales du thymus chez la souris, tandis que chez l'homme, c'est la cathepsine V (Nakagawa *et al.*, 1998; Tolosa *et al.*, 2003) et la cathepsine F qui effectueraient cette maturation au niveau des macrophages (Shi *et al.*, 1999a).

2.3.1.3. Apoptose

L'implication des cathepsines à cystéine dans le processus d'apoptose n'est pas encore bien caractérisée mais de nombreuses études, utilisant des inhibiteurs de cathepsines et des souris transgéniques, semblent démontrer leur rôle dans ce processus. Il existe deux voies de signalisation distinctes aboutissant à l'apoptose : la voie extrinsèque, via des récepteurs membranaires (comme le récepteur au TNF- α), et la voie intrinsèque ou « mitochondriale » ; ces deux voies faisant intervenir des protéases à cystéine appelées caspases (clan CD, famille C14), dont la caspase 3 qui est commune aux deux voies. En outre, une perméabilisation des lysosomes est également associée au processus d'apoptose entraînant la libération des cathepsines à cystéine. Ainsi, la cathepsine B serait impliquée dans l'activation des caspases via la libération de cytochrome c par la mitochondrie. En effet, après induction de l'apoptose par le TNF- α sur des hépatocytes, la caspase 8 engendre une augmentation de la cathepsine B dans le cytosol, permettant la libération du cytochrome c et aboutissant à l'apoptose. Chez des souris déficientes en cathepsine B, ce phénomène est fortement diminué (Guicciardi *et al.*, 2000). L'implication de la cathepsine B passerait par le clivage du facteur pro-apoptotique Bid (Cirman *et al.*, 2004; Stoka *et al.*, 2001). De plus, des études sur l'apoptose, associée à la réponse immunitaire, suggèrent que la cathepsine B est impliquée dans l'apoptose des cellules T suite à l'activation par des globulines anti-thymocyte (Michallet *et al.*, 2004). D'autre part, la cathepsine C participe à l'apoptose via l'activation de la granzyme B, qui active à son tour la caspase 3 (Pham & Ley, 1999).

2.3.2. Fonctions physiopathologiques

2.3.2.1. Ostéoporose

L'ostéoporose est une pathologie caractérisée par une dérégulation de l'homéostasie du tissu osseux. Les processus de résorption ne sont plus contrôlés, ce qui provoque une fragilisation

de la structure de la matrice osseuse jusqu'à la survenue de fractures. L'ostéoporose touche environ 10 % de la population en Europe, au Japon et en Amérique du nord, et plus de 150 millions de personnes en seraient atteintes dans le monde. Cette maladie touche particulièrement les femmes avec, en France, 40 % des femmes atteintes contre 8% d'hommes, ceci étant principalement dû aux changements hormonaux associés à la ménopause.

Les os sont constitués majoritairement de fibres de collagène de type I (90 %) qui fournissent le support au dépôt minéral. Pendant l'ostéoporose, les os perdent leurs composants minéraux ainsi que leur matrice organique à cause de l'activité des ostéoclastes. En effet, les ostéoclastes sécrètent des protons, qui acidifient leur environnement, et des enzymes protéolytiques, engendrant la résorption dite « acide » (Figure 13). Il y a déminéralisation dans un premier temps du tissu osseux puis les composants organiques, en particulier le collagène, sont dégradés. L'implication des cathepsines, principalement de la cathepsine K, fut découverte après des études de clonage et immunohistochimiques révélant que la cathepsine K est prédominante dans les ostéoclastes et qu'elle possède une activité collagénolytique (Brømme & Okamoto, 1995; Garnero *et al.*, 1998; Tezuka *et al.*, 1994). Le rôle critique de la cathepsine K dans la résorption osseuse est ensuite devenu évident après avoir découvert que la déficience en cathepsine K était la cause d'une maladie génétique, la pycnodysostose, touchant la structure des os (Gelb *et al.*, 1996).

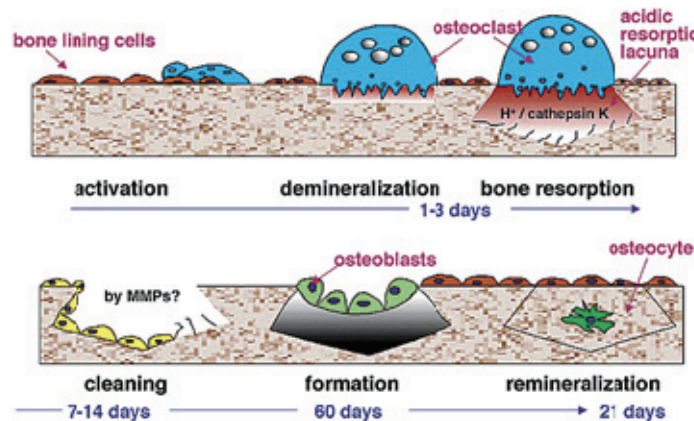


Figure 13 : Cycle du remodelage osseux

Ce schéma présente la cinétique du remodelage osseux. La cathepsine K, sécrétée par les ostéoclastes, intervient dans la phase de résorption au niveau de la lacuna, où elle dégrade la matrice organique (principalement le collagène de type I). (Pour revue : Lecaille *et al.*, 2002)

La cathepsine K a une expression 100 fois supérieure à celles des cathepsines B et L dans les ostéoclastes où elle représente 98 % de l'activité protéolytique totale des protéases à cystéine (Brömme & Okamoto, 1995). De plus, elle possède une activité collagénolytique très élevée et unique étant donné qu'elle est capable de cliver la triple hélice du collagène de type I en de multiples sites, contrairement à d'autres collagénases humaines (Fields *et al.*, 1987). Elle est ainsi sécrétée dans l'environnement extracellulaire au niveau des sites de résorption osseuse où elle dégrade le collagène de type I (Xia *et al.*, 1999). Il est à noter que son activité collagénolytique est dépendante de son interaction avec des GAG, les chondroïtine ou les kératane sulfates, tandis que son activité gélatinolytique ne l'est pas (Li *et al.*, 2002, 2004; Selent *et al.*, 2007).

2.3.2.2. Arthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde est une pathologie inflammatoire des articulations qui concerne environ 1 % de la population. Cette maladie, qui touche trois fois plus les femmes que les hommes, est caractérisée par une destruction progressive du cartilage et de l'os sous-chondral. Son évolution la plus grave conduit à une perte de la fonction de l'articulation (Lecaille *et al.*, 2002b). Le tissu cartilagineux est constitué de deux éléments majeurs : un réseau élastique de fibres de collagène de type II et d'agrégats multimoléculaires stabilisés par les agrécane donnant au tissu une résistance à la compression (Kempson *et al.*, 1973). La dégradation protéolytique excessive de l'un de ces deux composants conduit au développement d'un processus arthritique (Kempson *et al.*, 1976). Le cartilage subit des agressions provenant de trois sites différents : i/ de la surface lisse du pannus synovial formé de fibroblastes, de macrophages et de leucocytes infiltrés ; ii/ des chondrocytes activés du cartilage ; iii/ des ostéoclastes, des ostéoclastes non matures, des synoviocytes qui infiltrent le cartilage depuis le bord sous-chondral de l'os (Figure 14). Outre les métalloprotéases matricielles (ou *matrix metalloproteases*, MMP), il est maintenant établi que les cathepsines à cystéine, notamment les cathepsines L, B, K et S sont impliquées dans ces pathologies (Yasuda *et al.*, 2004). En effet, elles ont été identifiées dans les fibroblastes synoviaux (Hou *et al.*, 2001; Hummel *et al.*, 1998; Trabandt *et al.*, 1990) où leur expression est régulée par des facteurs pro-inflammatoires tels que l'IL-1, l'IFN- γ ou le TNF- α (Hou *et al.*, 2002; Lemaire *et al.*, 1997). Les synoviocytes de type A, proches des macrophages, expriment la cathepsine S ainsi que la cathepsine K (Hou *et al.*, 2002). N'apparaissant qu'à un stade avancé de la pathologie, la cathepsine K est produite majoritairement dans les ostéoclastes (Brömme *et al.*, 1996b; Drake *et al.*, 1996; Kontinen *et al.*, 2002). Les chondroblastes quant à eux synthétisent

principalement les cathepsines B et L. *In vitro*, ces différentes cathepsines sont capables de dégrader efficacement les agrécanes (Hou *et al.*, 2001; Nguyen *et al.*, 1991, 1990). L'activité des cathepsines est favorisée par une acidification au niveau des tissus cartilagineux d'arthrite rhumatoïde où la valeur de pH est proche de 5 (Konttinen *et al.*, 2002; Wilkins & Hall, 1995). Cette acidification renforce l'idée du rôle prépondérant des cathepsines à cystéine au dépend des MMP, celles-ci étant plutôt actives à des pH neutres voire légèrement alcalins.

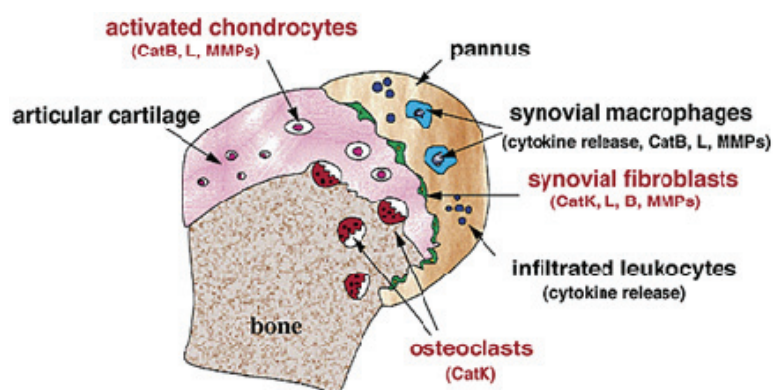


Figure 14 : Origine cellulaire des protéases durant l'arthrite rhumatoïde
(Pour revue : Lecaille *et al.*, 2002)

2.3.2.3. Athérosclérose

L'athérosclérose est la principale cause de mortalité dans les pays industrialisés. Elle est caractérisée par un épaissement et une perte de l'élasticité des parois internes des artères causant une réduction voire une obstruction du flux sanguin qui occasionne des infarctus cérébraux et des anévrismes de l'aorte. Un des signes précoces est la formation et le dépôt de plaques d'athérome dans la partie sous-endothéliale de l'intima. Ces plaques sont constituées initialement d'une accumulation de lipides en couches, et de macrophages. Ces plaques évoluent en plaques fibreuses avec l'apparition de cellules du muscle lisse de l'intima et de cellules conjonctives, en plus des lipides (Liu *et al.*, 2004). Les cathepsines S et K font l'objet de nombreuses études depuis qu'elles ont été localisées dans les macrophages et les muscles lisses des plaques d'athérome (Sukhova *et al.*, 1998; Taleb *et al.*, 2005). Leur expression est plus importante dans les artères de patients atteints d'athérosclérose que chez les patients sains, et elle augmente au fur et à mesure de l'évolution des plaques d'athérosclérose (Lutgens *et al.*, 2007). De plus, l'expression de la cystatine C, un inhibiteur endogène puissant des cathepsines, diminue de manière importante lors d'athérosclérose et lors de rupture d'anévrisme de l'aorte (Shi *et al.*, 1999b). L'implication des cathepsines a été confirmée par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de la cathepsine S ou de souris transgéniques n'exprimant pas les cathepsines S ou K. Dans ces modèles (souris apoE^{-/-}), la perte de l'une

des deux cathepsines entraîne une diminution de l'ordre de 40-50 % de l'aire des plaques d'athérosclérose (Lutgens *et al.*, 2005; Sukhova *et al.*, 1998). La forte activité élastinolytique des cathepsines S et K suggère que leur rôle est prépondérant dans la perte progressive de l'élasticité de la paroi artérielle (Shi *et al.*, 1992, 1994). La cathepsine F, retrouvée dans les macrophages d'intima d'artères coronaires de malades, occupe également une position clé dans la progression de cette maladie (Oörni *et al.*, 2004). Durant la formation des plaques d'athérosclérose, des particules de lipoprotéines de faible densité (ou *low density lipoprotein*, LDL) sont modifiées et fusionnent pour former des gouttelettes dans l'intima de l'artère. La protéolyse de constituants des LDL, les apolipoprotéines apoB-100, serait l'un des mécanismes impliqués dans la formation des gouttelettes (Oörni *et al.*, 2004). Les cathepsines F et S seraient responsables de cette dégradation et induiraient ainsi la fusion et le dépôt des LDL (Linke *et al.*, 2006).

2.3.2.4. Cancer

Durant les processus cancéreux, le développement tumoral passe par différentes étapes qui nécessitent l'action de protéases (Gocheva & Joyce, 2007). La première étape est l'induction de l'angiogenèse qui implique la dégradation de la matrice extracellulaire et la libération, ainsi que l'activation, de facteurs pro-angiogéniques. La deuxième est l'invasion des cellules cancéreuses dans l'environnement proche de la masse cancéreuse initiale, impliquant la destruction des jonctions intercellulaires en plus de la dégradation de la matrice extracellulaire. La dernière correspond à la dissémination de métastases, produisant les foyers secondaires, avec une intravasation des cellules cancéreuses dans la circulation sanguine et lymphatique, suivie de l'extravasation sur les sites secondaires (Palermo & Joyce, 2008). Une augmentation de l'expression et de l'activité de différentes protéases est retrouvée dans de nombreux cancers, et est souvent associée avec un mauvais pronostic pour les patients (Duffy & Duggan, 2004; Overall & Kleinfeld, 2006). Parmi ces protéases, les MMP ont longtemps été la cible majeure de recherches, tant sur le plan fondamental que pharmaceutique. Cependant, les échecs cliniques des inhibiteurs de MMP à la fin des années 1990 conduisirent la communauté scientifique à s'intéresser à d'autres classes de protéases (Coussens *et al.*, 2002; Turk, 2006). Ainsi, l'implication des cathepsines à cystéine a été mise en évidence et elles sont maintenant considérées comme des cibles thérapeutiques potentielles (Palermo & Joyce, 2008). Dans de nombreuses cellules cancéreuses humaines ou murines, leur activité est augmentée, et leur localisation cellulaire est différente de celle observée dans les cellules saines (Berdowska, 2004; Jedeszko & Sloane, 2004). Pour différents types de cancers, ces

changements dans l'expression et l'activité de ces protéases ont une valeur diagnostic et/ou pronostic, en particulier les cathepsines B et L (Turk *et al.*, 2004). De plus, les cellules cancéreuses ne sont pas la seule source de cathepsines au niveau des sites tumoraux car un grand nombre de types cellulaires présents dans l'environnement tumoral les expriment également (Figure 15). Les cathepsines à cystéine participent à plusieurs processus de la croissance tumorale et de la dissémination des métastases. Comme les MMP, leur rôle principal semble être la dégradation des constituants de la matrice extracellulaire, ce qui est favorisé par l'acidification de l'environnement tumoral généralement observé (Cardone *et al.*, 2005; Gillet *et al.*, 2009). Cette dégradation est indispensable à l'accroissement de la masse tumorale au sein des tissus, mais également à la vascularisation des tumeurs ainsi qu'à l'invasion des métastases.

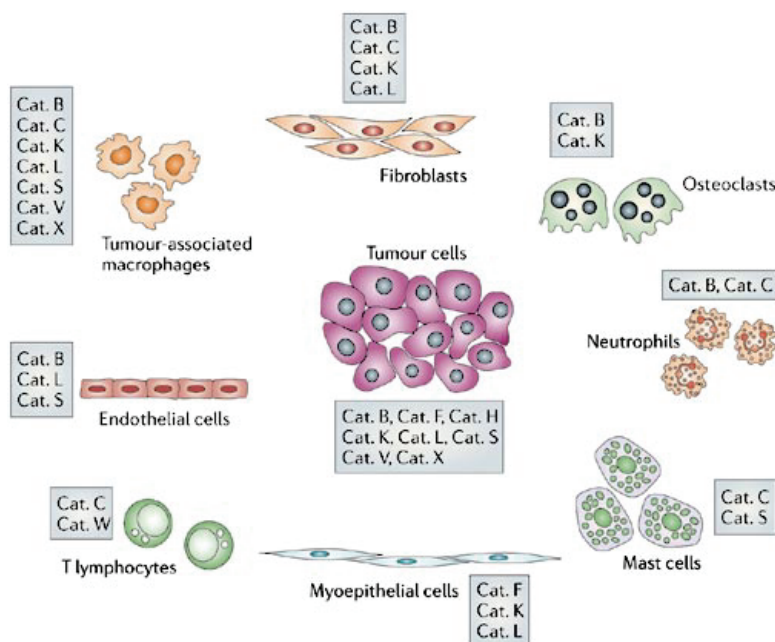


Figure 15 : Profil d'expression des différentes cathepsines à cystéine dans l'environnement tumoral

Au niveau du microenvironnement tumoral, les cathepsines sont produites par les cellules tumorales, et également par les cellules du stroma. (Mohamed & Sloane, 2006)

Ainsi, l'expression de la cathepsine B par les cellules tumorales est corrélée avec le développement de l'angiogenèse, alors que son blocage supprime l'angiogenèse dans un modèle de glioblastome (Kruszewski *et al.*, 2004; Yanamandra *et al.*, 2004). De manière similaire, les souris déficientes en cathepsine S présentent une angiogenèse tumorale faible, contrairement à ce qui est observé pour les souris déficientes en cathepsines L et C (Gocheva *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). Concernant leur rôle dans les cellules cancéreuses, l'inactivation génétique des cathepsines B, C, L et S dans le modèle RIP1-Tag 2 montre que

la cathepsine B participe à la formation tumorale, la croissance et l'invasion, la cathepsine S à la formation tumorale et l'invasion, et la cathepsine L à la croissance tumorale et l'invasion (Gocheva *et al.*, 2006). L'accroissement de la prolifération des cellules cancéreuses est également un des événements clés du processus tumoral. Les cathepsines à cystéine influencent la régulation de cette prolifération cellulaire par différentes voies. Ainsi, l'inhibition des cathepsines B ou L diminue la prolifération de cellules de carcinome pancréatique, alors qu'une déficience en cystatine C a l'effet inverse (Joyce & Hanahan, 2004; Sokol & Schiemann, 2004). En accord avec ces résultats, la cathepsine L a récemment été localisée dans le noyau cellulaire où elle peut activer le facteur de transcription CDP/Cux (Goulet *et al.*, 2004). Cependant, l'effet des cathepsines semble être tissu spécifique comme le montre les souris déficientes en cathepsine L, qui développent une hyperplasie dermique due à une hyperprolifération des kératinocytes (Roth *et al.*, 2000).

2.3.2.5. Autres pathologies

Outre les phénomènes pour lesquels l'implication des cathepsines est relativement bien définie, il existe un certain nombre de pathologies pour lesquelles elles semblent également participer. Ainsi, plusieurs études ont établi un lien entre les cathepsines à cystéine et les fonctions métaboliques. Une forte corrélation a été décrite entre le BMI et la surexpression de la cathepsine S aux niveaux transcriptionnel et protéique (pour revue : Lafarge *et al.*, 2010; Taleb & Clément, 2007). La cathepsine S est exprimée par les cellules adipeuses et pourrait participer à la différenciation des préadipocytes. De même, la production de cathepsine K est augmentée dans le tissu adipeux de patients en surpoids ou obèses, ainsi que dans certains modèles animaux. Elle pourrait également participer à l'adipogenèse de par sa capacité à dégrader l'élastine ou l'ostéonectine (Chiellini *et al.*, 2003). De plus, au niveau cérébral, outre la libération de neurotransmetteurs par la cathepsine L, la cathepsine B semble jouer un rôle important dans la maladie d'Alzheimer. La maladie d'Alzheimer est une maladie neuro-dégénérative caractérisée par la formation de plaques β -amyloïdes neurotoxiques dans le cerveau (Hook *et al.*, 2008). Cette plaque β -amyloïde est libérée à partir de son précurseur par des protéases couramment nommées β -sécrétase(s) ou γ -sécrétase(s), différenciant ainsi celles qui clivent aux extrémités amino- ou carboxyterminales du peptide β -amyloïde. La cathepsine B a été récemment proposée comme étant une β -sécrétase importante, notamment dans les vésicules de sécrétion (Hook *et al.*, 2005). Enfin, il a été montré que les cathepsines pouvaient participer à l'infection des cellules par différents types de virus, tels que les réovirus, les virus Hendra et Nipah ou encore le virus Ebola (Vasiljeva *et al.*, 2007). Lors de ces infections, les

cathepsines B ou L, présentes dans les endosomes, sont nécessaires à la maturation ou au clivage de particules virales, ce qui favorise la pénétration du virus dans le cytoplasme.

2.4. Les cathepsines à cystéine pulmonaires

2.4.1. L'inflammation pulmonaire

Les poumons occupent une place centrale au sein de l'organisme : ils apportent l'oxygène nécessaire au fonctionnement et au maintien de l'intégrité des tissus et des organes. De par leur rôle, ils sont en contact avec le milieu extérieur et par conséquent exposés à différents types d'agression comme les polluants, les allergènes ou bien encore les micro-organismes (virus, bactéries, champignons) entraînant des situations qui peuvent être fatales pour l'organisme. Outre la barrière physique représentée par l'épithélium respiratoire avec ses cellules ciliées et ses molécules antibactériennes, un des phénomènes permettant aux poumons de se défendre contre ces agressions est le développement d'une réaction inflammatoire. Cependant, dans certains cas, cette réaction inflammatoire va persister et devenir incontrôlable, entraînant des effets délétères pour les poumons. Le développement de cette réaction inflammatoire est une caractéristique commune à de nombreuses pathologies pulmonaires qui peuvent être d'origine génétique, comme la mucoviscidose, immunologique (asthme et allergie), infectieux ou dues à l'exposition à différents polluants environnementaux ou professionnels comme c'est le cas pour la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO).

L'inflammation pulmonaire est caractérisée par le recrutement et l'activation des cellules de l'immunité, et la libération par ces cellules, principalement, de nombreux médiateurs comme des cytokines (IL-8, TNF- α , IL-6...), des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF (pour *vascular endothelium growth factor*), des espèces oxydantes, et des protéases. Lors de ces pathologies inflammatoires, ces processus ne sont plus contrôlés avec pour conséquence, entre autre, un déséquilibre de la balance protéases / antiprotéases ainsi que oxydants / antioxydants, conduisant à la dégradation de la matrice extracellulaire. Tous ces phénomènes aboutissent à l'altération et/ou l'obstruction des voies respiratoires. Les protéases jouent un rôle important dans les pathologies inflammatoires où elles sont impliquées dans différents processus associés à l'inflammation comme la dégradation de la matrice extracellulaire ou bien encore le recrutement cellulaire.

2.4.1.1. Les protéases à sérine et les métalloprotéases

Les principales protéases étudiées dans le cadre de pathologies pulmonaires inflammatoires sont les protéases à sérine de neutrophiles et les MMP. Les sources principales de ces protéases dans les poumons sont les cellules inflammatoires telles que les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes. Les neutrophiles sont responsables de la libération de trois protéases à sérine : l'élastase, la cathepsine G et la protéinase 3 (Korkmaz *et al.*, 2010, 2008); tandis que les macrophages sont la principale source des MMP pulmonaires, et en particulier les MMP-1, -3, -9, -12 et -14 (Shapiro *et al.*, 1991). Une autre famille de métalloprotéases exprimée à la surface des macrophages est également présente : les ADAM (pour *A Desintegrin And Metalloprotease*) (Primakoff & Myles, 2000). Dans les conditions physiologiques, ces protéases sont régulées dans le milieu extracellulaire par leurs inhibiteurs propres présents en excès, avec pour les protéases à sérine : l' α_1 -antitrypsine, le SLPI (ou *secretory leukoprotease inhibitor*) et l'élafine (Moreau *et al.*, 2008); et pour les MMP : les TIMP (ou *tissue inhibitor of metalloprotease*). Cependant, en conditions inflammatoires, ces inhibiteurs ne sont plus suffisants pour réguler l'afflux de protéases et il en résulte une activité protéolytique excessive conduisant à la dégradation de la matrice extracellulaire du tissu pulmonaire. Outre leur capacité à dégrader les constituants de la matrice extracellulaire, ces protéases jouent un rôle prépondérant dans le recrutement cellulaire, via l'activation de médiateurs de l'inflammation, engendrant l'initiation et le maintien de la réaction inflammatoire. Elles sont capables de cliver et d'activer différentes cytokines et chimiokines, comme l'IL-8 (Van den Steen *et al.*, 2000; Walsh *et al.*, 2001) ou bien encore le TNF- α (Churg *et al.*, 2003; Primakoff & Myles, 2000).

2.4.1.2. Les cathepsines à cystéine et l'inflammation pulmonaire

L'implication des cathepsines à cystéine dans les processus inflammatoires est maintenant bien établie malgré un nombre d'études faible par rapport aux protéases à sérine et aux MMP (pour revue : Kasabova *et al.*, 2011; Veillard *et al.*, 2008). En effet, elles sont sécrétées par les macrophages et il y a également un déséquilibre de la balance protéases / inhibiteurs, cathepsines *versus* cystatines et kininogènes, en faveur des cathepsines, lors d'inflammations pulmonaires (Chapman *et al.*, 1997; Reddy *et al.*, 1995). De plus, les études réalisées au laboratoire sur l'activité protéolytique des cathepsines à cystéine pulmonaires révèlent une présence importante de cathepsines à cystéine extracellulaires, dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) de patients atteints d'inflammations pulmonaires aiguës, tandis que leurs inhibiteurs circulants principaux, les kininogènes, sont retrouvés très dégradés

(Serveau-Avesque *et al.*, 2006). Des résultats similaires ont été également observés chez des patients atteints de silicose, avec un déséquilibre entre les cathepsines et leurs inhibiteurs (Lalmanach *et al.*, 2006; Perdereau *et al.*, 2006). Ainsi, ces résultats suggèrent que les cathepsines à cystéine sont bien des acteurs importants dans les processus inflammatoires.

Malgré une expression plutôt ubiquitaire des cathepsines B, L, H et X au niveau du tissu pulmonaire, leurs niveaux d'expression selon les types cellulaires présentent des différences, d'après les études immunohistochimiques de localisation (Bühling *et al.*, 2004). Ainsi, les cathepsines B et L sont retrouvées majoritairement dans les cellules épithéliales bronchiques et les macrophages, la cathepsine H dans les cellules épithéliales de type II, et la cathepsine X dans les macrophages. A l'inverse, les cathepsines S et V présentent une expression spécifique dans les macrophages avec les cathepsines K et W, ces dernières étant également exprimées respectivement dans les cellules épithéliales bronchiques et certains lymphocytes.

Tableau 2 : Localisation des cathepsines à cystéine pulmonaires
(D'après Bühling *et al.*, 2004)

Enzyme	Profil d'expression dans le tissu pulmonaire (immunohistochimie)
Cathepsine B	Ubiquitaire Importante dans les cellules épithéliales bronchiques et les macrophages
Cathepsine H	Ubiquitaire Importante dans les macrophages et les pneumocytes de type II
Cathepsine K	Macrophages Cellules épithéliales bronchiques
Cathepsine L	Ubiquitaire Importante dans les cellules épithéliales bronchiques et les macrophages
Cathepsine S	Macrophages
Cathepsine X	Ubiquitaire Importante dans les macrophages
Cathepsine W	Importante dans les macrophages Présente dans certains lymphocytes

Parmi les implications que peuvent avoir les cathepsines à cystéine dans l'inflammation, leur participation à la génération de kinines à partir de leurs précurseurs, les kininogènes, pourrait jouer un rôle important. Les kinines, bradykinine et lysyl-bradykinine, sont en effet impliquées dans les processus inflammatoires avec d'une part une action sur les cellules musculaires lisses, entraînant la vasodilatation et la contraction, et d'autre part elles stimulent

la production de nombreuses molécules pro-inflammatoires comme l'IL-1 ou bien encore le TNF- α (Duncan *et al.*, 2000). Les deux voies principales de génération des kinines font intervenir les kallikréines tissulaires et plasmatiques (Bhoola *et al.*, 1992; Müller-Esterl, 1987). Cependant des voies protéolytiques alternatives sont également proposées et en particulier l'implication de la cathepsine L qui est capable de libérer des kinines (Desmazes *et al.*, 2003). A l'inverse, la cathepsine K a une activité kininase avec un clivage de la bradykinine entre les résidus 4 et 5 (Gly et Phe) (Godat *et al.*, 2004; Lecaille *et al.*, 2007b). En plus de son rôle de kininogénase, la cathepsine L serait également impliquée dans la régulation de l'IL-8 par clivage (Ohashi *et al.*, 2003). Des cellules épithéliales déficientes en cathepsine L présentent une sécrétion en IL-8 bien supérieure aux cellules normales (Wille *et al.*, 2002).

2.4.2. BPCO et emphysème

La BPCO, qui est un terme générique pour désigner un ensemble de pathologies pulmonaires obstructives, est un problème majeur de santé publique, et elle est annoncée comme la 3^{ème} cause de mortalité en 2020. Elle se caractérise par une obstruction progressive et irréversible des voies aériennes conduisant à une insuffisance respiratoire pouvant conduire à une mort précoce. Elle est principalement due au tabagisme, bien que d'autres facteurs environnementaux ou innés puissent avoir un rôle. Le terme BPCO regroupe principalement deux états pathologiques : la bronchite chronique, avec le développement d'une fibrose, une hypersécrétion de mucus et une obstruction des voies aériennes ; et l'emphysème, caractérisé par une destruction du parenchyme pulmonaire et une perte de l'élasticité pulmonaire. La majorité des patients présente les deux états, avec généralement une évolution progressive de la bronchite vers l'emphysème.

L'inflammation prend une part importante dans la physiopathologie de la BPCO, avec un stress oxydatif important généré par les neutrophiles et les macrophages activés, qui libèrent une quantité importante d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ainsi que des enzymes protéolytiques. Les protéases, associées aux ROS, entraînent le remodelage et la dégradation des composants majeurs de la matrice extracellulaire et de la membrane basale. Les cathepsines à cystéine en sont en partie responsables, aux côtés des protéases à sérine et des MMP (Houghton *et al.*, 2008; Lecaille *et al.*, 2002b; Turk *et al.*, 2001b). Les fibres d'élastine confèrent l'élasticité aux vaisseaux sanguins et au tissu pulmonaire, et leur dégradation

incontrôlée est associée à un large spectre de désordres incluant l'emphysème. Six des onze cathepsines à cystéine humaines (les cathepsines B, F, K, L, S et V) possèdent une activité élastinolytique. Alors que la cathepsine K clive l'élastine pulmonaire moins rapidement que l'élastine aortique *in vitro*, les macrophages dégradent l'élastine aussi bien extra-qu'intracellulairement (Novinec *et al.*, 2007). Les cathepsines K et S sont les principales enzymes impliquées dans la dégradation extracellulaire, alors que la cathepsine V est principalement impliquée dans la digestion lysosomale (Yasuda *et al.*, 2004). La protéolyse est favorisée par l'adhérence des macrophages dérivés de monocytes aux fibres d'élastine, où ils forment un environnement confiné associé à une acidification péricellulaire due à la présence de pompes à protons de type H⁺/ATPase (Punturieri *et al.*, 2000). Les cathepsines pourraient également participer à l'homéostasie du collagène durant les pathologies inflammatoires pulmonaires (dégradation excessive pendant l'emphysème ; dépôt de constituants de la matrice par les fibroblastes lors de fibrose). En effet, il a été proposé que les cathepsines à cystéine prennent part à la dégradation extracellulaire du collagène, et en particulier la cathepsine K, avec son activité collagénolytique unique de par sa capacité à cliver les collagènes de type I et II dans les régions organisées en triple hélice (pour revue : Lecaille *et al.*, 2008).

2.4.3. Asthme et allergie

L'asthme est une pathologie inflammatoire chronique qui touche 300 millions de personnes dans le monde avec une prévalence en constante augmentation, en particulier dans les pays en voie de développement. Elle se caractérise par une activation des mastocytes, une infiltration des éosinophiles et une augmentation du nombre de cellules Th 2 (pour *T helper*), qui conduisent l'inflammation avec la génération de nombreuses cytokines (Hamid & Tulic, 2009). L'inflammation chronique entraîne une augmentation de la masse des cellules musculaires lisses, une fibrose et une néo-vascularisation.

Un des phénomènes qui participe à la physiopathologie est l'hypersécrétion de mucus, associée à l'hyperplasie des glandes sécrétrices du mucus. La sécrétion de mucus est une réponse normale en cas d'agressions des poumons qui permet de protéger les muqueuses des voies aériennes supérieures. Les protéases sont impliquées dans cette augmentation de la synthèse et de la sécrétion des mucines. Cette sécrétion dépend de l'activation du récepteur du facteur de croissance épithélial (ou *Epithelial Growth Factor Receptor*, EGFR). Différents

ligands sont capables d'activer ce récepteur comme le TGF- α (pour *Transforming Growth Factor- α*) ou l'EGF (*Epithelial Growth Factor*) (Burgel & Nadel, 2004). Les principales protéases impliquées dans cette maturation sont les ADAM, en particulier ADAM-17, ainsi que l'élastase (Kohri *et al.*, 2002; Lemjabbar *et al.*, 2003).

Les études concernant l'implication des cathepsines dans cette pathologie ont révélé que la cathepsine S jouait un rôle important, et pourrait représenter un biomarqueur de l'état d'avancement de la pathologie (Cimerman *et al.*, 2001; Fajardo *et al.*, 2004). En effet, dans un modèle d'hypersensibilité pulmonaire chez la souris, l'inhibition de la cathepsine S bloque l'infiltration des éosinophiles, réduit le stress oxydatif et l'inflammation ((Riese *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2009). Des études génétiques et pharmacologiques font état de son implication dans le développement de la réponse allergique et des études précliniques sont en cours avec des inhibiteurs de cathepsine S dans le cas d'asthme bronchique (Deschamps *et al.*, 2011; Vasiljeva *et al.*, 2007). La cathepsine F semble également être impliquée et sa régulation pourrait moduler la réponse immune excessive qui est associée à ce type de pathologies (Somoza *et al.*, 2002).

2.4.4. Autres pathologies pulmonaires

Parmi les pathologies pulmonaires qui ont une composante inflammatoire, on retrouve la dysplasie bronchopulmonaire (ou DBP). Cette maladie est une complication courante chez les enfants prématurés qui subissent en particulier une ventilation mécanique prolongée. Ces enfants souffrent ainsi d'une inflammation chronique associée à un développement insuffisant des alvéoles pulmonaires et des capillaires, représentant également un terrain propice aux infections respiratoires (Coalson, 2003). Un des phénomènes impliqué dans la DBP est le manque de régulation des enzymes élastinolytiques par leurs inhibiteurs naturels. Les sécrétions des patients présentent une forte activité « élastase », représentée par l'élastase et les MMP-2 et -9, peu de potentiel inhibiteur et une production anormale d'élastine (Bruce *et al.*, 1992; Merritt *et al.*, 1983). En ce qui concerne les cathepsines, outre un déséquilibre similaire de la balance cathepsines / inhibiteurs, une diminution de la cathepsine K est associée à une augmentation extracellulaire du collagène, ce qui semble l'impliquer dans le développement de la fibrose au cours de la DBP (Knaapi *et al.*, 2006). Des souris déficientes en cathepsine S révèlent aussi l'implication de cette cathepsine où elle tiendrait un rôle central dans la régulation de la composante fibrotique de la DBP (Hirakawa *et al.*, 2007).

La cathepsine K participerait également à d'autres pathologies inflammatoires où un dépôt de collagène anormal est observé comme la sarcoïdose et la silicose (Lalmanach *et al.*, 2006). En outre, un contrôle insuffisant des autres cathepsines, principalement les cathepsines B, H, L et S, est rapporté dans ces pathologies, suggérant leur rôle potentiel dans la physiopathologie. En effet, l'étude des LLBA des patients atteints de silicose révèlent la présence de ces cathepsines sous forme mature, et leur activité protéolytique est sous-réglée par leurs inhibiteurs (70 nM vs 9 nM) (Perdereau *et al.*, 2006). Ce déséquilibre de la balance cathepsines / inhibiteurs est également observé chez les patients atteints de sarcoïdose et de protéinose alvéolaire, et les kininogènes sont en plus retrouvés dégradés (Serveau-Avesque *et al.*, 2006). Pour finir, on observe également la présence de zymogènes activables qui peuvent donc représenter un réservoir protéolytique.

3. La protéine SP-A du surfactant pulmonaire

La protéine SP-A est un constituant majeur du surfactant pulmonaire qui participe à l'homéostasie des poumons. En effet, les poumons représentent une large surface de contact avec l'environnement extérieur, nécessaire pour permettre un apport en oxygène suffisant pour un bon fonctionnement métabolique (Daniels & Orgeig, 2003; Orgeig *et al.*, 2007). Cependant, il en résulte des contraintes de deux ordres : des contraintes physiques, dues à l'action mécanique des poumons, et de défense compte tenu du contact avec l'air extérieur. Ainsi, les poumons possèdent pour lutter contre ces contraintes un système complexe de macromolécules, appelé surfactant pulmonaire, qui répond à ces exigences via ses propriétés biophysiques ainsi qu'anti-infectieuses. Ce mélange complexe de lipides et de protéines est assemblé et sécrété au niveau de la surface respiratoire par des cellules spécialisées de l'épithélium alvéolaire.

Le terme surfactant a pour origine la contraction de l'anglais « *surface active agent* ». Le premier postulat de l'existence du surfactant pulmonaire fut fait en 1929 par Kurt von Neergaard (Von Neergaard, 1929) puis il fallut attendre 25 ans pour avoir une première caractérisation (Clements, 1956; Pattle, 1955). La compréhension du rôle du surfactant pulmonaire a ensuite été mieux caractérisée avec son implication directe dans le syndrome de détresse respiratoire (SDR) qui est dû à une déficience en surfactant, chez des enfants prématurés (Avery & Mead, 1959). Ces premières études ont permis de déterminer son rôle crucial dans l'homéostasie pulmonaire et se poursuivirent jusque dans les années 1980 où une première étude préclinique a été conduite chez des enfants SDR montrant les effets bénéfiques d'une administration de surfactant (Fujiwara *et al.*, 1980). C'est également à cette époque que les premières études structurales et fonctionnelles furent menées à partir de surfactant de porc (Robertson *et al.*, 1990). Ces différentes études ont ainsi permis de découvrir le mélange complexe de lipides et de protéines que représente le surfactant pulmonaire.

Le surfactant pulmonaire se compose de lipides, majoritairement des phospholipides tels que les phosphatidylcholines, et de 4 protéines spécifiques appelées SP-A, SP-B, SP-C et SP-D (SP pour *surfactant protein*) aux propriétés multiples. SP-B et SP-C sont des protéines hydrophobes qui sont principalement impliquées dans la dynamique de synthèse et le rôle mécanique du surfactant. Elles sont responsables, en particulier, de la capacité du surfactant à

réduire la tension de surface et ainsi éviter le collapsus pulmonaire (Frerking *et al.*, 2001), tandis que les protéines amphiphiles, SP-A et SP-D, jouent un rôle prédominant dans la défense pulmonaire (pour revue : Kuroki *et al.*, 2007). Ce complexe lipo-protéique est assemblé dans les pneumocytes de type II où il forme des inclusions dans des organelles appelés corps lamellaires (CL). Après sécrétion, le surfactant se déploie rapidement afin de recouvrir la surface respiratoire. Il s'organise de manière à permettre les échanges de molécules entre la phase gazeuse et la phase liquide. Dans le même temps, il optimise les échanges de nombreuses molécules avec les cellules endothéliales, tout en protégeant l'organisme contre les pathogènes (Wright, 2005).

3.1. Le surfactant

3.1.1. Les phospholipides

L'analyse de LLBA a permis de déterminer que les lipides représentent 90 % du surfactant pulmonaire dont la majorité sont des phospholipides (Tableau 3). La répartition des lipides varie selon l'espèce mais également en fonction de l'état de maturation et l'état physiologique du poumon. En outre, la variabilité inter-individus observée ne permet pas de parler de surfactant « normal » (Veldhuizen & Possmayer, 2004). Parmi ces phospholipides, les plus importants, de par leur abondance mais également leur rôle primordial dans les propriétés tensio-actives du surfactant pulmonaire, sont les phosphatidylcholines, représentant environ 70 % des lipides, et en particulier le dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC). D'après les nombreuses études sur les caractéristiques physiques du surfactant en fonction de la composition en lipides, le DPPC est considéré comme le principal responsable de la réduction de la tension de surface par le surfactant (pour revue : Veldhuizen *et al.*, 1998). Cette hypothèse est soutenue par l'étude d'une enzyme, la lysophosphatidylcholine acétyltransférase ou LPCATI, responsable de la maturation de ce lipide (Nakanishi *et al.*, 2006).

Tableau 3 : Composition lipidique moyenne du surfactant pulmonaire chez l'homme
(D'après Hamm *et al.*, 1996)

Phosphatidylcholines (PC) saturées	50 %
Phosphatidylcholines insaturées	17 %
Phosphatidylglycérol (PG)	7 %
Phosphatidyléthanolamine (PE)	4 %
Phosphatidylinositol (PI)	2 %
Sphingomyéline (SPH)	2 %
Autres phospholipides	3 %
Lipides neutres et cholestérol	5 %

3.1.2. Les protéines hydrophobes : SP-B et SP-C

Les protéines hydrophobes du surfactant, SP-B et SP-C, sont essentielles pour les fonctions respiratoires et l'homéostasie pulmonaire dès la naissance. Ces protéines participent activement au déploiement, à la structure et à la stabilité du surfactant pulmonaire au niveau de l'interface air-liquide, nécessaire à la réduction de la tension de surface dans les alvéoles pulmonaires. De plus, SP-B et SP-C participent également à la régulation des processus intracellulaires et extracellulaires permettant la synthèse des composants du surfactant ainsi que sa sécrétion.

3.1.2.1. Structure et fonctions de SP-B

Les premières descriptions de la protéine SP-B et de l'implication de protéines hydrophobes dans la structure du surfactant pulmonaire ont été faites dans les années 1970 (King *et al.*, 1973; Phizackerley *et al.*, 1979). Malgré les nombreuses études qui ont suivies jusqu'à aujourd'hui, qui établissent l'importance fonctionnelle de SP-B dans le surfactant, son implication spécifique dans la structure et la fonction du surfactant n'est pas encore bien décortiquée. Le SP-B est synthétisé sous forme de précurseurs de 381 résidus dans les pneumocytes de type II au niveau des alvéoles pulmonaires et il est mûré par clivage afin d'obtenir la protéine mûre de 79 résidus (environ 18 kDa) (Weaver & Whitsett, 1989). Après le transport du précurseur du RE à l'appareil de Golgi, puis dans les corps multivésiculaires (CMV), celui-ci est clivé pour donner la protéine SP-B mûre durant le transit des CMV vers les CL (pour revue : Weaver & Conkright, 2001). C'est au niveau des CL que sont stockés SP-B, SP-C et les phospholipides du surfactant, où ils vont s'associer et ensuite être sécrétés pour former les tubules de myéline (TM), en interagissant avec SP-A, ainsi que le film de surfactant à l'interface air-liquide.

SP-B est présent au niveau du surfactant sous forme d'oligomères, principalement dimériques, via des ponts disulfures, où il interagit avec les phospholipides, en particulier le DPPC. Cette interaction se fait par l'intermédiaire de ses domaines en hélice, qui ont un caractère amphiphile, permettant ainsi l'ancrage de SP-B à la surface lipidique (Figure 16) (Hawgood *et al.*, 1998). Le rôle de SP-B est directement médié par cette interaction qui permet à la fois de lyser les vésicules lipidiques et de les faire fusionner. Ainsi, SP-B participe à l'organisation des lipides au niveau des CL en intracellulaire et également en extracellulaire, où il permet l'absorption des lipides pour former le film de surface. En outre, il joue un rôle critique dans l'homéostasie du surfactant car il est impliqué directement dans la stabilité de ce

film durant les phénomènes de compression et d'expansion dus à la mécanique respiratoire, contrainte physique qui peut entraîner le collapsus pulmonaire.

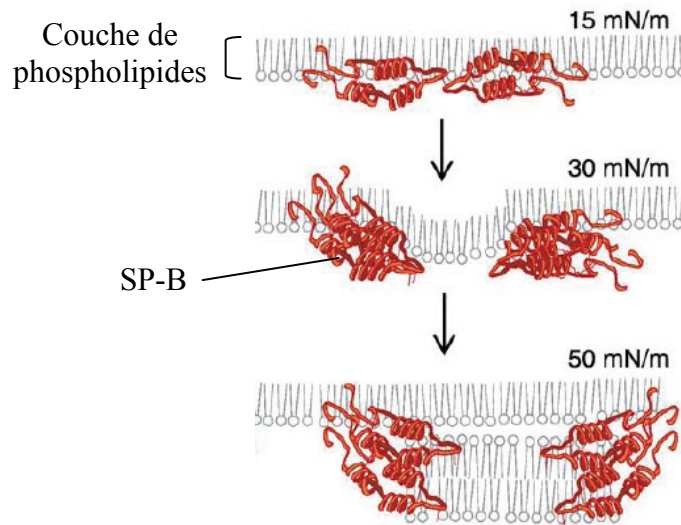


Figure 16 : Interaction du SP-B avec la couche lipidique du surfactant

SP-B est ancré à la couche lipidique et il multiplie ses interactions avec les couches lorsque la tension superficielle du film augmente (valeurs en milliNewton par mètre, mN/m).

(D'après Pérez-Gil, 2008)

3.1.2.2. Structure et fonctions de SP-C

La protéine du surfactant SP-C est constituée de 35 résidus et est très riche en valine, leucine et isoleucine, ce qui en fait l'une des protéines les plus hydrophobes du protéome. Comme SP-B, le SP-C est synthétisé sous forme de précurseurs, de 197 résidus, et mûré dans les CMV des pneumocytes de type II (Johansson, 2001). Cependant sa structure est très différente de celle de SP-B, ce qui lui permet de s'insérer dans les couches de phospholipides (Figure 17) (Horowitz *et al.*, 1992). En effet, SP-C est principalement formé d'une hélice α très hydrophobe qui prend place entre les phospholipides, et est ancré aux lipides au niveau des têtes hydrophiles de ceux-ci grâce aux charges situées à l'extrémité N-terminale de SP-C. De plus, il peut posséder un acide palmitique, lié de manière covalente par des résidus cystéines, capable de se déplacer dans la couche de lipides ou bien encore entre les couches, et ainsi faciliter la formation du film de surface recouvrant les alvéoles. Outre l'implication de SP-C dans la formation et la stabilité du film de surface comme SP-B, il serait impliqué dans le recyclage et la clairance du surfactant (Horowitz *et al.*, 1993).

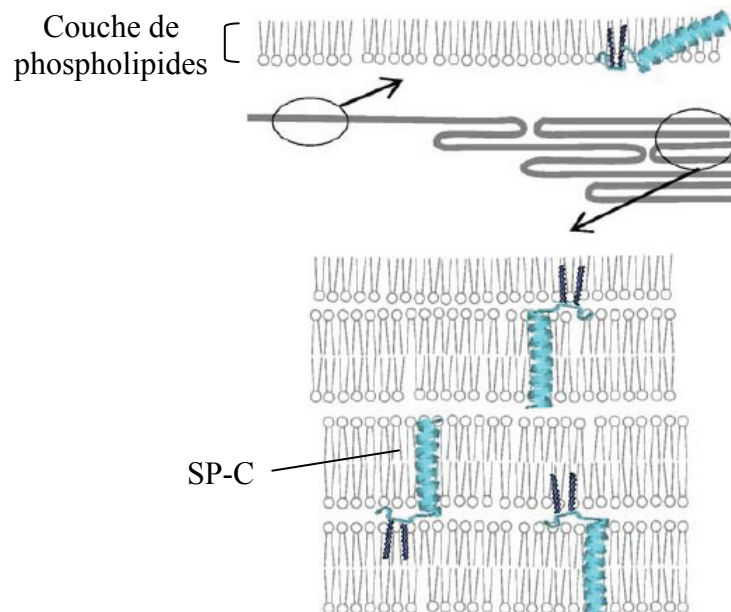


Figure 17 : Ancrage du SP-C aux couches lipidiques du surfactant

SP-C s'insère dans les couches lipidiques du surfactant, et ainsi participe à la formation du film de surface. La portion protéique du SP-C est en bleue et les acides palmitiques en noir. (D'après Pérez-Gil, 2008)

3.1.3. Les protéines hydrophiles : les collectines SP-A et SP-D

Les protéines du surfactant SP-A et SP-D appartiennent à la superfamille des lectines de type C, dépendantes du calcium, et au sous-groupe des collectines car elles possèdent un domaine de type collagène (Gupta & Surolia, 2007). On distingue 9 collectines dont les mieux caractérisées sont SP-A, SP-D et MBP (pour *Mannose Binding Lectin*). La collectine MBP est une protéine sérique tandis que SP-A et SP-D sont présentes principalement au niveau des poumons, dans l'espace alvéolaire (Lu *et al.*, 2002; van de Wetering *et al.*, 2004). Outre leur implication dans la structure du surfactant, SP-A et SP-D tiennent un rôle clé dans la défense innée (Wright, 2005). En effet, elles sont capables d'interagir avec un certain nombre de pathogènes ainsi qu'avec les cellules de l'immunité et prennent donc part à la régulation de l'immunité pulmonaire ainsi qu'aux processus inflammatoires. Leurs implications dans ces différents phénomènes sont principalement dépendantes d'un domaine clé, le domaine de reconnaissance des sucres, appelé CRD (pour *Carbohydrate Recognition Domain*) (pour revue : Haagsman *et al.*, 2008; Kishore *et al.*, 2006). Ce domaine CRD leur permet d'interagir avec les groupements glycosidiques, sous la dépendance du calcium, présent à la surface des pathogènes et des cellules. De plus, il est également capable de se lier aux lipides, que ce soit

au niveau des membranes cellulaires et des pathogènes, ou à ceux constituant le surfactant. Tous ces points seront traités en détail pour SP-A dans la partie 3.2.

3.1.4. Synthèse et dégradation du surfactant pulmonaire

La synthèse et la sécrétion du surfactant sont assurées principalement par les pneumocytes de type II même si les cellules de Clara synthétisent également des protéines du surfactant au niveau des voies aériennes. Alors que la sécrétion des lipides constitutifs du surfactant se fait exclusivement par les CL, il en est tout autre pour les protéines du surfactant SP-A et SP-D. En effet, les protéines SP-B et SP-C sont sécrétées en même temps que les lipides en passant par les CL, tandis que SP-A et SP-D ont une voie parallèle de sécrétion indépendante des CL.

3.1.4.1. Métabolisme intracellulaire et extracellulaire

Les lipides sont transportés directement du RE vers les CMV puis vers les CL. Ils peuvent également être acheminés dans les CL via des voies parallèles avec une synthèse des lipides cytoplasmique. La translocation des lipides dans les CL fait intervenir des transporteurs de la famille des ABC (pour *ATP-binding cassette*) et en particulier l'isoforme ABCA3. Des mutations de cette isoforme sont corrélées avec un dysfonctionnement dans la formation et la composition des CL chez des nouveau-nés (Edwards *et al.*, 2005; Shulenin *et al.*, 2004). Les protéines SP-B et SP-C, après maturation dans le RE et l'appareil de Golgi, sont dirigées avec les lipides dans les CMV pour finir dans les CL (Figure 18) (pour revue : Weaver *et al.*, 2002). Contrairement aux protéines hydrophobes, SPA et SP-D semblent être sécrétées par les voies conventionnelles de sécrétion (Rooney, 2001). Cependant, des études révèlent la présence de SP-A et SP-D dans les CL mais ceci pourrait être expliqué par les phénomènes de recyclage du surfactant ainsi qu'une variabilité inter-espèces de synthèse du surfactant (Fehrenbach, 2001).

Après un signal de sécrétion, les CL migrent vers la membrane apicale des cellules puis sont sécrétés par exocytose (Mason & Voelker, 1998). Les voies de signalisation entraînant la sécrétion du contenu des CL *in vitro* sont nombreuses, passant par la stimulation des récepteurs adrénergiques ou bien encore purinergiques ; mais leur implication *in vivo* n'est pas vérifiée (Rooney, 2001). Par contre, il semble que la sécrétion nécessite un stimulus entraînant une élévation du calcium intracellulaire (Tschumperlin & Margulies, 1998; Wirtz & Dobbs, 1990).

Dans l'espace alvéolaire, le complexe lipides-protéines provenant des CL va s'associer au SP-A pour former les TM (Froh *et al.*, 1990; Suzuki *et al.*, 1989). Ces structures, dépendantes de SP-A et de SP-B, semblent représenter un intermédiaire entre la sécrétion et la formation du film de surface mais leur rôle n'est pas encore bien établi. En effet, les souris déficientes en SP-A présentent une homéostasie du surfactant normale ainsi qu'un métabolisme des lipides conservé (Ikegami *et al.*, 1998; Korfhagen *et al.*, 1996). Au niveau de l'interface air-liquide, le surfactant se répand et forme une couche lipidique active qui réduit la tension de surface.

3.1.4.2. Recyclage et voie de dégradation

Une forte proportion du surfactant semble être recyclée par un mécanisme d'endocytose par les pneumocytes de type II pour être réintégrée dans les CL (Schmitz & Müller, 1991). Par ultracentrifugation des LLBA, on distingue deux fractions distinctes de surfactant : la forme LA (pour larges agrégats) et PA (pour petits agrégats) (Magoon *et al.*, 1983). La forme LA est de composition lipidique et protéique similaire à celle des TM, CL et CMV, et représente la fraction active du surfactant. A l'inverse, la fraction PA est constituée de petites vésicules dont la composition protéique est faible comparée à la fraction LA (Veldhuizen & Possmayer, 2004). Cette fraction PA correspond à la conversion de la forme LA après plusieurs cycles respiratoires, et c'est cette fraction qui est endocytée par les pneumocytes de type II.

Les protéines et les lipides de la fraction PA sont transportés dans les endosomes tardifs par des vésicules sous la dépendance des clathrines ou de la polymérisation de l'actine, principalement (Jain *et al.*, 2005; Wissel *et al.*, 2001). Ensuite, les lipides internalisés vont être acheminés vers les CL, phénomène qui requiert l'action de la calmoduline. En ce qui concerne les protéines, et en particulier SP-A, il semblerait que la majorité soit dégradée. En outre, les mécanismes qui déterminent l'orientation vers le recyclage plutôt que la dégradation, et inversement, ne sont pas encore élucidés. A côté des pneumocytes de type II, les macrophages alvéolaires participent également à la dégradation du surfactant, et en particulier des lipides avec la participation de la phospholipase A2 (Hiraoka *et al.*, 2006; Whitsett & Weaver, 2002).

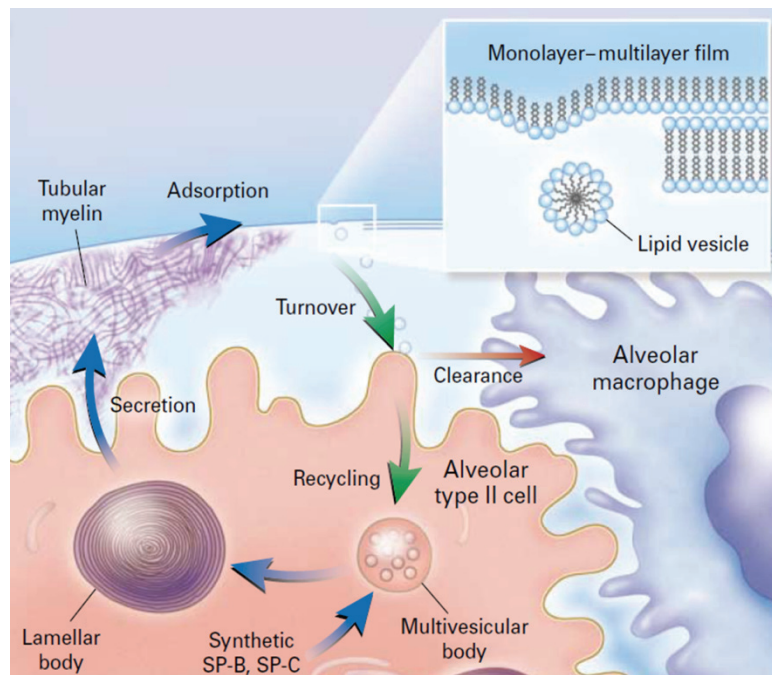


Figure 18 : Métabolisme et catabolisme du surfactant pulmonaire
(Whitsett & Weaver, 2002)

3.1.5. Les pathologies pulmonaires associées au surfactant

L'implication physiopathologique du surfactant pulmonaire a été mise en évidence pour la première fois chez les enfants prématurés souffrant de SDR, mais depuis, de nombreuses études concernant des pathologies pulmonaires révèlent la présence d'un surfactant anormal. Ce défaut en surfactant normal peut être dû à une composante héréditaire directe comme dans le cas de la déficience en SP-B ou SP-C, ou un symptôme associé à des maladies pulmonaires ayant des origines multiples comme l'asthme, la BPCO, la mucoviscidose ou bien encore la protéinose alvéolaire (Tableau 4) (pour revue : Griese, 1999).

Tableau 4 : Variation des principaux constituants du surfactant en fonction des pathologies pulmonaires

Les encadrés bleus correspondent aux pathologies plus spécifiquement évoquées dans le texte.
(D'après Griese, 1999)

Disease	Protein	Phospho-lipid	Phospholipid class						Protein			Surface tension γ_{min}	[Ref]
			PC	PG	PI	PE	PS	SPH	LPC	SP-A	SP-B	SP-D	
Smoker	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	[44, 46, 49, 50, 60]
Obstructive lung disease	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	[44, 46, 49, 50, 60]
Asthma	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	[62, 69, 70]
Bronchiolitis	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	[71]
COPD	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	[39]
Lung transplantation	↑	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	[72, 73]
Infection and suppurative lung disease													
Cystic fibrosis	=	=	↓	↓	↑	=	=	↑	=	↑	=	↑	[23, 47, 69]
Pneumonia	↑	↓	=	↓	↑	=	=	↑	=	↓	=	↑	[25, 34, 39]
AIDS + related pneumonia	↑	↓	=	↓	↑	=	=	↑	=	↓	=	↑	[25]
No HIV, pneumocystis+	↑	=	=	↓	↑	=	=	↑	=	↓	=	↑	[53, 59]
HIV+, pneumocystis+	↑	↓	=	↓	↑	=	=	↑	=	↓	=	↑	[61]
HIV+, no pneumocystis+	↓	=	=	↓	↑	=	=	↑	=	↓	=	↑	[61, 74]
HIV+, pulmonary involvement	↑	↓	=	↓	↑	=	=	↑	=	↓	=	↑	[61, 74]
HIV+, no pulmonary involvement	=	↓	=	↓	↑	=	=	↑	=	↓	=	↑	[37]
Acute lung injury and lung oedema	↑	↓	=	↓	↑	=	=	↑	=	↓	=	↑	[37, 75]
ARDS													
Hydrostatic lung oedema	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	[25, 38, 39, 52, 54-56]
Cardiogenic lung oedema	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	[52]
Disease specific to neonates and infants	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	[25]
RDS													
BPD	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	[76-80]
SIDS	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	[35]
Interstitial lung disease													
Sarcoidosis	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	[80, 81]
Idiopathic pulmonary fibrosis	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	[36, 40, 43, 48, 58, 62, 82]
Exogen allergic alveolitis	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	[34, 36, 40, 43, 45, 48, 51, 58]
Interstitial pneumonia with collagen disease	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	[46, 48, 82, 83]
Silicosis	↓	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	[43]
Asbestosis	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	[36]
Miscellaneous lung disease													
Pulmonary alveolar proteinosis	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	[21, 39, 41-43, 57]
Eosinophilic granuloma	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	[40]
Microthiasis	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	[84]
Irradiation of the thorax	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	[85, 86]

Surfactant parameters are shown as unchanged (=), significantly increased (↑) or decreased (↓), as determined by the primary study in relation to the appropriate control group. Each symbol represents the data from one study. Not all studies measured all parameters. Data from a total of 34 studies in which the results were expressed as concentrations in the volume recovered were used. Other studies in which the results were reported as ratios compared to protein or other variables were excluded. These studies used relatively small numbers of subjects (14.0±8.2, range 4-50). The experiments with the pulsating bubble surfactometer were performed at various phospholipid concentrations (2 mg·mL⁻¹, range 0.76-28.5) and values after >3 min were used for calculations. PC: phosphatidylcholine; PG: phosphatidylglycerol; PI: phosphatidylinositol; PE: phosphatidylethanolamine; PS: phosphatidylserine; SPH: sphingomyelin; LPC: lysophosphatidylcholine; SP: surfactant protein; γ_{min} : minimum surface tension; COPD: chronic obstructive pulmonary disease; ARDS: adult respiratory distress syndrome; AIDS: acquired immune deficiency syndrome; HIV: human immunodeficiency virus; RDS: respiratory distress syndrome; BPD: bronchopulmonary dysplasia; SIDS: sudden infant death syndrome.

3.1.5.1. Syndrome de détresse respiratoire : SDR et SDRA

Il faut distinguer le syndrome de détresse respiratoire chez les enfants prématurés dit « SDR » du syndrome aigü touchant les enfants et les adultes dit « SDRA » (pour syndrome aigü de détresse respiratoire). Ces deux syndromes sont caractérisés par une augmentation de la tension de surface associée à une diminution du SP-A ainsi que du pourcentage en phosphatidylcholines, comme le DPPC, et en phosphatidylglycérols (Jobe, 2006; Mingarro *et al.*, 2008). Cependant, le SDRA se différencie par une augmentation en phosphatidylinositol (Gregory *et al.*, 1991).

Le SDR, ou syndrome de détresse respiratoire idiopathique du prématuré, est la première cause de désordre respiratoire chez les enfants prématurés, et une des causes les plus communes de morbidité. En effet, son taux d'incidence est élevé et est en relation directe avec l'importance de la prématurité. Ainsi, en absence de prophylaxie, il est de 80 % à moins de 28 semaines, 60 % entre 28 et 30 semaines, 30 % à 31-32 semaines. L'étiologie de ce syndrome est une déficience en surfactant due à un défaut de production. La production du surfactant démarre à 22 semaines chez le fœtus ; et les poumons sont considérés comme matures, avec un surfactant actif, à environ 35 semaines. Les enfants prématurés n'ont donc pas les poumons complètement développés avec une production en surfactant insuffisante, ce qui induit des difficultés de respiration chez l'enfant. Il en résulte une hypoxie, une perte de l'intégrité de l'épithélium alvéolaire et une diminution de la production de surfactant. Le défaut de surfactant génère une atelectasie, une réduction du volume pulmonaire, et une diminution de l'expansion (Jobe, 1993). Il y a également un dépôt anormal de fibrine et de déchets cellulaires au niveau des alvéoles, qui forme une membrane appelée hyaline, ce qui a valu au SDR de porter également le nom de maladie des membranes hyalines.

Le SDRA a été décrit pour la première fois en 1967 (Ashbaugh *et al.*, 1967). Ce syndrome est associé, ou est la résultante, de traumatismes comme une hypotension, des transfusions multiples, une septicémie, ou bien encore une pancréatite (Gregory *et al.*, 1991). Le SDRA se caractérise par des dommages alvéolaires diffus touchant à la fois l'épithélium alvéolaire et l'endothélium capillaire, induisant une augmentation de la perméabilité interstitielle et un œdème alvéolaire (Tomashefski, 2000; Ware & Matthay, 2000). Une composante inflammatoire est également associée au SDRA qui participerait à l'exacerbation des symptômes de ce syndrome. Il n'existe pas de réelle définition du syndrome et le diagnostic est déterminé grâce à des critères cliniques comme le degré d'hypoxie, la pression positive en

fin d'expiration ou PEEP (pour *positive end-expiratory pressure*), mais également à l'aide de la radiographie des poumons où est visualisé l'œdème avec ses infiltrations.

3.1.5.2. Déficience héréditaire en SP-B et SP-C

La déficience héréditaire en SP-B et SP-C, causée par des mutations sur les gènes codant pour ces deux protéines, SFTPB et SFTPC, est associée à une défaillance pulmonaire aigüe et des pathologies pulmonaires interstitielles.

Plus de 22 mutations distinctes sont dénombrées sur le gène SFTPB (codant SP-B) induisant une défaillance pulmonaire ; et celle-ci se développe dans les 48h après la naissance (Nogee *et al.*, 2000). Outre l'apparition d'un SDR chez les enfants atteints par ces mutations, celles-ci peuvent aussi conduire à une protéinose alvéolaire pulmonaire (PAP), dite congénitale, qui se caractérise par une accumulation de surfactant anormale dans les alvéoles pulmonaires (Seymour & Presneill, 2002). Ces mutations entraînent la mort des nouveau-nés dans les premières semaines après la naissance. L'absence de SP-B ne permet pas le traitement des enfants, que ce soit avec du surfactant artificiel ou avec une ventilation mécanique, et la seule alternative reste la transplantation pulmonaire (Hamvas *et al.*, 1997). Au niveau cellulaire, la déficience en SP-B entraîne une accumulation aberrante du précurseur de SP-C en intracellulaire, dans l'espace alvéolaire, et également dans le liquide amniotique, qui permet par ailleurs le diagnostic du défaut en SP-B (Vorbroker *et al.*, 1995). Il existe également des mutations très rares qui entraînent une déficience partielle en SP-B, et qui sont associées à des maladies pulmonaires interstitielles (Ballard *et al.*, 1995; Dunbar *et al.*, 2000; Klein *et al.*, 1998). La protéine SP-B est produite en faible quantité ou sous forme incomplète partiellement fonctionnelle.

En ce qui concerne SP-C, les mutations sur le gène SFTPC sont associées à des fibroses pulmonaires atypiques, une infiltration de macrophages, un remodelage vasculaire avec une fibrose, ainsi qu'une perte de l'espace respiratoire et de la surface alvéolaire (Nogee *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2002). Malgré les études effectuées sur ces maladies, la contribution dans la pathogenèse de SP-C, absent ou non conformé, ou bien encore l'accumulation de son précurseur, n'est pas élucidée.

3.1.5.3. Traitements à base de surfactant

A l'heure actuelle, les traitements à base de surfactant sont utilisés en clinique pour traiter le SDR mais de nombreuses études portent sur d'autres pathologies comme dans le cas du syndrome d'aspiration du méconium ou bien encore de pneumonies congénitales (Findlay *et al.*, 1996; Herting *et al.*, 2000). Cependant, ces essais ne révèlent pas un réel bénéfice de l'utilisation de surfactant dans ces pathologies.

Les premières études satisfaisantes concernant l'administration de surfactant furent réalisées sur des animaux dans les années 1970. L'instillation de surfactant naturel chez des lapins prématurés et des agneaux a ainsi montré le potentiel que représente le surfactant exogène dans le traitement du SDR (Adams *et al.*, 1978; Enhörning & Robertson, 1972). C'est en 1980 que le premier essai clinique a été mené sur 10 enfants prématurés avec du surfactant bovin modifié (Fujiwara *et al.*, 1980). Par la suite, de nombreux essais cliniques ont eu lieu et un certain nombre de surfactants a vu le jour, d'origines naturelles ou synthétiques (Tableau 5) (pour revue : Halliday, 2008). Ainsi on distingue 5 classes de surfactants : les anciens surfactants synthétiques ne contenant pas de protéine et les nouveaux composés de protéines analogues (*Old-* et *New-synthetic*, respectivement) ; et les surfactants naturels extraits de poumons hachés, de lavages pulmonaires ou de liquide amniotique (*Natural* 1, 2 et 3).

Tableau 5 : Surfactants exogènes
(D'après Halliday, 2008)

Synthétiques, anciens (sans protéine)	- Pumactant (ALEC®) - Colfosceril palmitate (Exosurf®) - Turfsurf (Belfast surfactant®)
Synthétiques, nouveaux (avec protéines analogues)	- Lucinactant (Surfaxin®) - rSP-C surfactant (Venticule®)
Naturels de type 1 (extraits de poumons hachés)	- Surfactant TA (Surfacten®) - Beractant (Survanta®) - Poractant alfa (Curosurf®)
Naturels de type 2 (extraits de lavages pulmonaires)	- CLSE (bLES®) - Calfactant (Infasurf®) - SF-RI1 (Alveofact®)
Naturel de type 3 (extrait du liquide amniotique)	- Surfactant humain

3.2. La protéine SP-A du surfactant pulmonaire

La protéine SP-A, avec SP-D, est une protéine qui joue un rôle important dans la défense pulmonaire contre les pathogènes respiratoires et les allergènes (Kishore *et al.*, 2005). Elle est codée à partir de deux gènes, situés sur le chromosome 10, donnant les isoformes SP-A1 et SP-A2 (Floros, 2001). Cette collectine forme un octadecamère (18 monomères) de 630 kDa correspondant à l'association de 6 sous-unités, elles-mêmes composées de 3 chaînes polypeptidiques de 35 kDa chacune (Figure 19). Chaque chaîne polypeptidique (monomère) est constituée de 4 régions : i/ une région N-terminale, ii/ un domaine de type collagène, iii/ une région de coude (neck), et iv/ un domaine globulaire de type lectine C, le domaine CRD. Cette association en octadecamère forme une structure dite « en bouquet de tulipes », dénomination due à la similarité observée par microscopie électronique (Voss *et al.*, 1988).

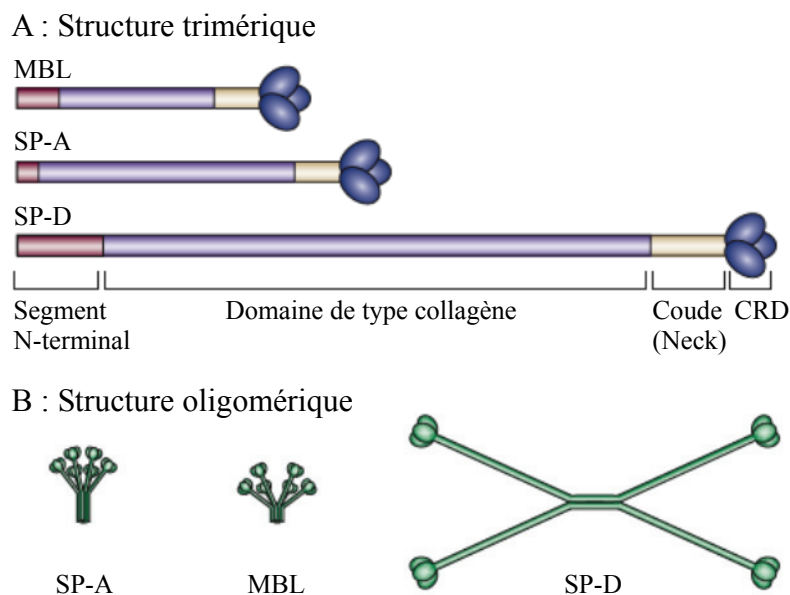


Figure 19 : Structures des collectines MBL, SP-A et SP-D

Représentation schématique de la structure de la lectine MBL (*mannose binding lectin*) et des protéines du surfactant SP-A et SP-D. (CRD : domaine de reconnaissance des sucres). (D'après Wright, 2005)

3.2.1. Structure

3.2.1.1. Segment N-terminal

Le segment N-terminal du SP-A n'est constitué que de 7 à 10 résidus, contrairement au SP-D qui en dénombre 25. Cependant il contient trois motifs structuraux importants : des cystéines qui stabilisent l'oligomérisation des chaînes polypeptidiques en formant des ponts disulfures interchaînes, une région hydrophobe conservée et un site de glycosylation (McCormack *et al.*,

1999). Le rôle de la chaîne oligosaccharidique liée au segment N-terminal via ce site de glycosylation n'est pas connu et sa délétion n'affecte pas l'interaction du SP-A aux lipides (McCormack *et al.*, 1994a). En ce qui concerne les résidus cystéines, on distingue deux isoformes de SP-A avec soit un seul résidu cystéine en position 6 (Cys⁶), soit un deuxième résidu supplémentaire en position -1 (Cys⁻¹) (Elhalwagi *et al.*, 1997). Ces deux résidus peuvent former des ponts disulfures interchaînes qui participent à la stabilisation de la structure quaternaire de SP-A en octadecamère. En outre, des études chez le rat et le chien révèlent qu'en l'absence de ponts disulfures interchaînes, SP-A forme tout de même des structures oligomériques complexes (Kuroki *et al.*, 1988; Voss *et al.*, 1988). Cependant, la présence du segment N-terminal est essentielle pour la formation des structures du surfactant, telles que les TM, et l'absence de Cys⁶ a un effet délétère sur l'activité tensio-active du surfactant (McCormack *et al.*, 1997a; Palaniyar *et al.*, 2000).

3.2.1.2. Domaine de type collagène

Le domaine de type collagène est constitué de motif répété Gly-X-Y avec en position Y pour SP-A, soit une proline, soit une hydroxyproline (McCormack, 1998). Ce domaine forme une triple hélice, et il y a une interruption du motif répété au centre du domaine générant un angle d'environ 60°, ce qui permet l'inclinaison du domaine globulaire du SP-A (Figure 20) (Voss *et al.*, 1988). Les groupements hydroxyl (-OH) de la proline, ou de l'hydroxyproline, permettent la formation de liaisons hydrogène interchaînes. Ces liaisons hydrogène sont associées à d'autres liaisons faibles non-covalentes, de type Van der Waals et électrostatiques, qui stabilisent la triple hélice. Cette stabilisation par ce type de liaison rend ce domaine, et donc SP-A, sensible aux changements physicochimiques de son environnement tels que le pH, la présence d'ions et la force ionique (Palaniyar *et al.*, 1998; Ridsdale *et al.*, 1999). Le domaine collagène du SP-A semble jouer un rôle important dans la liaison avec les récepteurs cellulaires et pour l'inhibition spécifique de la sécrétion du surfactant par les pneumocytes de type II isolés, mais l'interaction directe de ce domaine avec ces récepteurs n'est pas établie (Chroneos *et al.*, 1996).

3.2.1.3. Région de coude (*coiled-coil neck*)

Cette région en coude d'environ 35 résidus fait le lien entre le domaine collagène et le domaine CRD. Elle forme une longue hélice α , selon les modélisations moléculaires, avec un caractère amphiphile (McLean *et al.*, 1993). Elle est impliquée dans le repliement du SP-A et en particulier dans la trimérisation des sous-unités, comme le montrent les formes

recombinantes de SP-A ne contenant que cette région associée au domaine CRD (McCormack *et al.*, 1999). Ainsi, il semblerait qu'elle joue un rôle critique dans la direction de l'oligomérisation et dans l'association en triple hélice (Hoppe *et al.*, 1994). En effet, en absence de cette région, le domaine collagène peut former des oligomères dans les deux directions selon l'axe N- et C-terminal (Liu *et al.*, 1998).

3.2.1.4. Domaine de reconnaissance des sucres (CRD)

Le domaine de reconnaissance des sucres, CRD, est capable d'interagir avec de nombreuses espèces moléculaires incluant les carbohydrates, les phospholipides et les lipopolysaccharides (LPS), sous la dépendance du calcium (Clark *et al.*, 2000). Cette fonctionnalité du CRD confère au SP-A ses fonctions antimicrobiennes et ses fonctions dans l'homéostasie du surfactant. Il est constitué d'environ 115 résidus et forme un domaine globulaire composé de structures en hélices α , en feuillets β ou de boucles. Il est stabilisé par la présence de deux résidus cystéine qui forment des ponts disulfures intramoléculaires (Palaniyar *et al.*, 2000). D'après la structure cristallographique du SP-A partielle, Neck-CRD, ainsi que la comparaison avec d'autres collectines comme MBP-A, SP-A posséderait deux sites potentiels (nommé sites P et A) de fixation au calcium où le site principal P serait critique pour l'interaction avec les carbohydrates (Figure 20) (Head *et al.*, 2003; Håkansson *et al.*, 1999; Weis *et al.*, 1992). La fixation du calcium entraîne un changement de conformation du CRD, avec en particulier une augmentation des feuillets β , qui favoriserait la résistance à la protéolyse (McCormack *et al.*, 1994b; Sohma *et al.*, 1993).

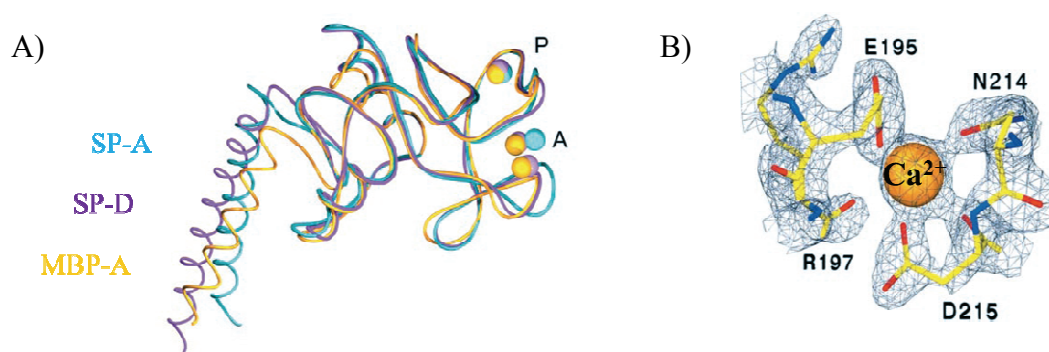


Figure 20 : Sites de fixation du calcium sur le SP-A, le SP-D et la MBP-A

A : Comparaison des sites primaires (P) et auxiliaires (A) de fixation du calcium des domaines CRD du SP-A, du SP-D et de la MBP-A (*mannose binding protein A*). B : Site primaire de fixation du calcium au niveau du domaine CRD du SP-A et résidus impliqués. (D'après Head *et al.*, 2003)

3.2.2. Interactions avec les phospholipides

L'interaction des protéines du surfactant avec les phospholipides au niveau alvéolaire est essentielle pour la formation du film de surfactant à l'interface air-liquide. Cependant l'importance de la liaison du SP-A avec les phospholipides au niveau du surfactant n'est pas bien élucidée. D'après les nombreuses études menées, il apparaît que la protéine SP-A joue un rôle important dans la formation des TM avec SP-B et le DPPC (Suzuki *et al.*, 1989). En effet, les animaux déficients en SP-A montrent une faible quantité voire l'absence de cette structure (Korfhagen *et al.*, 1996). De plus, SP-A stabiliserait la fraction active du surfactant LA (Veldhuizen *et al.*, 1994). Ainsi, d'après de nombreuses études *in vitro* et *in vivo*, un certain nombre de fonctions potentielles au niveau pulmonaire, dépendant de l'interaction SP-A-lipides, est proposé (Tableau 6) (Casals, 2001).

Tableau 6 : Activités et fonctions potentielles du SP-A liées à l'interaction avec les lipides (D'après Casals, 2001)

Activités in vitro du SP-A	Fonctions potentielles
- Agrégation des vésicules phospholipidiques en présence ou non de SP-B ou SP-C (dépendant du pH)	Emballage des bicouches dans les vésicules sécrétrices ou d'endocytose
- Agrégation des vésicules de lipides en présence ou non de SP-B ou SPC (dépendant du calcium) - Conduit le transfert et l'échange de phospholipides entre les monocouches des membranes lipidiques - Participe à l'adsorption des phospholipides à l'interface air-liquide avec SP-B - Stabilise les monocouches de surfactant à faible pression et favorise l'élimination des lipides, autres que le DPPC, sous la compression	Favorise les propriétés biophysiques du surfactant
- Inhibition de la conversion LA-PA - Diminue l'inhibition de l'activité du surfactant par les protéines interagissant avec les lipides ou les lipoprotéines sériques	Empêche l'inactivation du surfactant
- Entraîne l'absorption du surfactant par les pneumocytes de type II isolés	Homéostasie du surfactant
- Liaison et agrégation du lipopolysaccharide (LPS) rugueux - Agrégation des bactéries à Gram négatif via le lipide A...	Défense antibactérienne

3.2.2.1. Déterminants structuraux des phospholipides

De nombreuses méthodes biochimiques et biophysiques ont été utilisées pour déterminer les différents aspects de l'interaction du SP-A avec les membranes lipidiques. Ainsi, un certain nombre de modèles de membranes lipidiques ont été testés, en solution ou immobilisés sur support, ainsi que l'influence des facteurs physicochimiques comme le pH, la force ionique ou la température (pour revue : Casals, 2001). En ce qui concerne la nature des phospholipides liés, il ressort de ces études que l'interaction est dépendante de l'état de saturation des chaînes d'acides gras ou encore des groupements polaires au niveau des têtes des phospholipides. SP-A se lie spécifiquement aux phospholipides avec un groupement phosphatidylcholine et une chaîne lipidique saturée. Ainsi, SP-A se lie avidement au DPPC et à la sphingomyéline (Kuroki & Akino, 1991). Cette affinité est confirmée par beaucoup d'études d'agrégation de vésicules, en particulier avec des vésicules composées de DPPC et de dipalmitoylphosphatidylglycérol (DPPG) (Casals *et al.*, 1993; King *et al.*, 1983; Ruano *et al.*, 1998). Cependant, elle peut également se lier aux vésicules de phosphatidyl-choline (PC), -inositol (PI), -glycérol (PG) et -éthanolamine (PE), en présence de calcium (Meyboom *et al.*, 1999).

3.2.2.2. Eléments clés du SP-A pour l'interaction aux phospholipides et l'agrégation

La cartographie des domaines du SP-A impliqués dans l'interaction aux phospholipides a été déterminée grâce aux études de mutagenèse. Ainsi, il a été montré que le site de liaison était situé au niveau des domaines C-terminaux, et en particulier le CRD. La double mutation au niveau du domaine CRD, Glu195Gln et Arg197Asp, entraîne la perte de l'agrégation des liposomes (McCormack *et al.*, 1994b). De plus, l'anticorps monoclonal nommé ID-6, dirigé contre le domaine CRD, inhibe l'agrégation de liposomes constitués de DPPC, PG et PC, ainsi que la liaison à ces phospholipides ; tandis que celui dirigé contre le domaine neck, 6E3, n'influence pas ces deux phénomènes (Kuroki *et al.*, 1994). L'utilisation de l'anticorps 6E3 a ainsi révélé que la région neck n'était pas impliquée contrairement à ce qui avait été suggéré dans une étude précédente (Ross *et al.*, 1986).

Les études de mutagenèse ont également révélé l'implication du calcium et permis de montrer que le phénomène d'agrégation est dépendant du calcium tandis que la liaison aux phospholipides ne serait pas nécessairement dépendante du calcium (McCormack *et al.*, 1994a; Pattanajitvilai *et al.*, 1998). En effet, contrairement au processus d'agrégation des

vésicules où la dépendance au calcium est bien établie, pour la liaison lipide-SP-A, les études sont contradictoires. Kuroki *et al* avaient caractérisé cette dépendance avec du DPPC adsorbé sur un gel de silice (Kuroki & Akino, 1991) mais d'autres études montrent que la liaison du SP-A à des vésicules de DPPC ne serait pas directement dépendant du calcium, mais plutôt de l'état physique des vésicules (gel ou liquide) (Casals *et al.*, 1993; King *et al.*, 1986). En outre, il y a aussi des résultats contradictoires pour la liaison du SP-A aux LPS ainsi qu'aux glycosphingolipides (Casals, 2001). En ce qui concerne les lipoglycanes que l'on retrouve sur l'enveloppe des mycobactéries avec lesquels interagit le SP-A, la liaison serait dépendante du calcium (Sidobre *et al.*, 2000). Ainsi, il semblerait que ces deux phénomènes, liaison et agrégation, fassent appel à des régions distinctes au niveau du domaine CRD.

3.2.3. Liaison aux pathogènes

SP-A interagit directement avec de nombreux microorganismes comme les bactéries et les virus ainsi que les champignons et les levures (Tableau 7) (pour revue : Haagsman *et al.*, 2008). L'interaction a lieu avec les glycoconjugués et les lipides présents à la surface des microorganismes via le domaine CRD, sauf dans le cas du virus HSV (*herpes simplex virus*). En effet, la liaison au virus a lieu via le groupement oligosaccharidique du segment N-terminal du SP-A (van Iwaarden *et al.*, 1992). Mise à part cette exception, SP-A est ainsi capable de se lier aux résidus mannose et glucose, ligands présents à la surface d'une large gamme de microorganismes (Weis *et al.*, 1998).

L'interaction du SP-A avec ces pathogènes permet de protéger les poumons de l'infection en engendrant de manière directe l'agglutination, l'inhibition de la croissance des pathogènes ou bien encore la neutralisation. Cependant, SP-A participe également à la régulation de la réponse immunitaire par opsonisation et en stimulant la phagocytose, ainsi qu'en modulant la réponse inflammatoire. (Ces derniers points seront traités dans la partie 3.2.5.)

Tableau 7 : Pathogènes liés par SP-A et SP-D
(D'après Haagsman *et al.*, 2008)

Species	SP-A	SP-D
Fungi and yeasts		
Aspergillus fumigatus	☒	☒
Pneumocystis carinii	☒	☒
Cryptococcus neoformans	☒	☒
Candida albicans	☒	☒
Histoplasma capsulatum	☒	☒
Gram-negative bacteria		
Escherichia coli	☒	☒
Haemophilus influenzae	☒	☒
Klebsiella pneumoniae	☒	☒
Pseudomonas aeruginosa	☒	☒
Helicobacter pylori		☒
Chlamydia trachomatis	☒	☒
Chlamydia pneumoniae	☒	☒
Gram-positive bacteria		
Staphylococcus aureus	☒	☒
Streptococcus pneumoniae	☒	☒
Group B Streptococcus	☒	
Alloiococcus otitis	☒	
Mycobacteria		
Mycobacterium tuberculosis	☒	☒
Mycobacterium avium	☒	☒
Mycobacterium bovis BCG	☒	
Mycoplasmas		
Mycoplasma pneumoniae	☒	☒
Mycoplasma pulmonis	☒	
Viruses		
Herpes simplex virus	☒	
Rotavirus		☒
Respiratory syncytial virus	☒	☒
Human immunodeficiency virus		☒
Influenza A virus	☒	☒

SP-A est en particulier capable de se lier au LPS, un des constituants majeurs de la membrane des bactéries à Gram négatif et un stimulant de l'inflammation (Ulevitch & Tobias, 1995). Cependant, cette interaction n'est possible qu'avec un seul sérotype, le LPS rugueux (*Rough*, ou R-LPS). Il existe deux sérotypes de LPS, rugueux et lisse (*Smooth*, ou S-LPS), qui se distinguent par leur composition. Le S-LPS est constitué de l'antigène spécifique O, d'un corps oligosaccharidique et du lipide A (Tableau 8). Contrairement au S-LPS, le R-LPS est dépourvu de l'antigène O et possède un corps oligosaccharidique plus ou moins long suivant les souches. On distingue ainsi les souches Ra, Rb, Rc, Rd et Re. Les études d'interaction directe révèlent que SP-A se lie aux souches avec un Rc-LPS, forme du LPS de la souche *Escherichia coli* J5 (Ec-J5) par exemple, et un Re-LPS ainsi qu'au lipide A (Sano *et al.*, 1999).

Tableau 8 : Diagramme schématique des structures de S-LPS et R-LPS de *Salmonella minnesota* O (m O) et d'*Escherichia coli*
(D'après Barclay & Scott, 1987)

Espèce	Sérotype	Structure
		AgO corps LipideA
<i>Salmonella m. O</i>	S-LPS	OPS GlcNac Glc Gal Glc Hep Hep KDO Lipid A P P-P P
	R-LPS (souches)	Ra Rb Rc Rd Re
<i>Escherichia coli</i>	S-LPS	OPS Glc GlcNac Glc Hep Hep KDO Lipid A P P-P P
	Rc (<i>E. coli</i> J5)	Glc GlcNac Glc Hep Hep KDO Lipid A P P-P P

OPS, O polysaccharide; GlcNac, N-acetylglucosamine; Glc, glucose; Gal, galactose; Hep, heptose. P représente des groupements phosphorylés (phosphorylethanolamine principalement).

L'interaction du SP-A avec les pathogènes peut entraîner leur agglutination, inhiber leur croissance ou dans le cas des virus, les neutraliser (Kuroki *et al.*, 2007). Ainsi SP-A est par exemple capable d'agglutiner *Klebsiella pneumoniae*, en se fixant sur sa capsule polysaccharidique, *Escherichia coli* (R-LPS, lipide A) ou bien encore *Haemophilus influenzae* de type A via la protéine membranaire P2 (Kabha *et al.*, 1997; McNeely & Coonrod, 1994; Sano *et al.*, 1999). Il diminue également la croissance d'*Escherichia coli*, ainsi que de *Mycoplasma pneumoniae*, en faisant une liaison avec les PG présents à la surface de ce mycoplasme (Piboonpocanun *et al.*, 2005). De plus, il neutralise le virus grippal Influenza A et le virus respiratoire syncytial (Benne *et al.*, 1995; Ghildyal *et al.*, 1999).

3.2.4. Récepteurs cellulaires

Outre les pathogènes, le SP-A est capable de se fixer à différents types cellulaires comme les macrophages, les pneumocytes de type II et les neutrophiles. Ainsi de nombreuses études ont cherché à déterminer les récepteurs pouvant être impliqués, et un certain nombre de récepteurs potentiels sont maintenant décrits (Tableau 9) (Kishore *et al.*, 2006). Selon les récepteurs, le site d'interaction du SP-A est représenté par le domaine collagène, le domaine CRD ou la région neck. Ainsi, la liaison aux récepteurs CD93, CD91 et SPR210 se ferait par le domaine collagène tandis que les autres récepteurs, dont le site de liaison est connu, se fait par le domaine CRD, comme SIRP α , ou la région neck.

Tableau 9 : Récepteurs et protéines liées par SP-A et SP-D, et fonctions associées
(Kishore *et al.*, 2006)

Receptor/binding protein	Interacting protein and domain	Cells expressing the receptor	Proposed functions
56 kDa (Malhotra <i>et al.</i> , 1990)	SP-A	Monocytes, macrophages, neutrophils, endothelial cells, platelets, microglia	Phagocytosis
C1qRp (CD93) (Nepomuceno <i>et al.</i> , 1997)	SP-A (collagen region)	Monocytes, macrophages, neutrophils, endothelial cells, platelets, microglia	Originally proposed to have a role in phagocytosis
SPR210 (Chronos <i>et al.</i> , 1996)	SP-A (36 residue long collagen region containing RGD motif)	Bone marrow derived macrophages, alveolar macrophages, type II cells	Phagocytosis, regulation of phospholipid secretion, regulation of cytokine production, inhibition of T-cell proliferation
55 kDa (Stevens <i>et al.</i> , 1995) 50 kDa (Kresch <i>et al.</i> , 1998)	SP-A	Alveolar type II cells	Phospholipid uptake
SIRP α (CD172) (Gardai <i>et al.</i> , 2003)	SP-A, SP-D (CRD)	Myeloid cells, neurons, endothelial cells, B-cells, antigen presenting cells	Inhibition of pro-inflammatory cytokine production
Calreticulin and CD91 (Gardai <i>et al.</i> , 2003)	SP-A, SP-D (collagen region)	Ubiquitous	Phagocytosis and production of pro-inflammatory cytokines
gp340 (Holmskov <i>et al.</i> , 1997)	SP-A, SP-D (CRD region)	Soluble opsonin	Stimulation of alveolar macrophage migration; an opsonin
CD14 (Sano <i>et al.</i> , 2000)	SP-A (neck region) binds the peptide portion containing the leucine-rich repeats of CD14; SP-D (CRDs) binds the carbohydrate moiety of CD14	Alveolar macrophages	Modulation of the CD14-LPS interaction and probably release of pro-inflammatory cytokines

3.2.5. Régulation de l'immunité

3.2.5.1. Opsonisation et régulation de la phagocytose

Les études *in vivo* chez des souris déficientes en SP-A révèlent l'importance de cette collectine dans la clairance des bactéries et également des virus. En effet, l'absence de SP-A augmente le taux d'infections par les streptocoques du groupe B, par *Pseudomonas aeruginosa* ou encore par *Pneumocystis carinii* (LeVine *et al.*, 1997, 1998; Linke *et al.*, 2001). Il en va de même pour la clairance du virus respiratoire syncytial où il est montré qu'une administration de SP-A exogène restaure la clairance de ce virus (LeVine *et al.*, 2001).

Parmi les effets de l'interaction du SP-A avec les pathogènes, SP-A est capable de favoriser la phagocytose des bactéries par un phénomène d'opsonisation. Il fixe les pathogènes, via son domaine CRD, entre autre, puis se lie aux récepteurs des cellules phagocytaires par son domaine collagène principalement. Ainsi, SP-A fixe et favorise la phagocytose de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* ou bien encore *Mycobacterium tuberculosis* (Kabha *et al.*, 1997; Mariencheck *et al.*, 1999; McNeely & Coonrod, 1993; Pasula *et al.*, 1997). Certains récepteurs impliqués dans l'opsonisation par SP-A sont identifiés comme le récepteur CD93 (ou C1qRp), sur les monocytes, pour la phagocytose de *Staphylococcus aureus* ou SP-R210, sur les macrophages, pour le bacille de Calmette & Guérin (BCG) (Geertsma *et al.*, 1994; Weikert *et al.*, 1997). Il est à noter que dans certains cas cependant la fixation du SP-A au pathogène peut également inhiber la phagocytose comme pour *Pneumocystis carinii* (Koziel *et al.*, 1998). Une étude montre que SP-A fixe ce pathogène mais cela entraîne une inhibition de la phagocytose par les macrophages, ce qui signifie que non seulement SP-A empêche la reconnaissance du pathogène par les récepteurs macrophagiques mais de plus il augmente la pathogénicité de *Pneumocystis carinii*.

SP-A est également capable de favoriser l'opsonisation par d'autres opsonines comme les IgG ou le complément, par une activation de type C1q (Tenner *et al.*, 1989). C1q est une protéine de la cascade du complément qui possède un domaine collagène et globulaire, et elle est capable d'activer les cellules phagocytaires, via son domaine collagène, et d'optimiser la phagocytose (Kishore *et al.*, 2004). Ainsi, SP-A qui a une structure homologue à C1q, peut interagir et activer les cellules macrophagiques de façon similaire et stimuler la phagocytose.

Il existe un troisième mécanisme par lequel SP-A augmente la phagocytose, indépendamment de toute liaison aux pathogènes, en modifiant l'expression membranaire des récepteurs de surface (Kuroki *et al.*, 2007; Wright, 2005). SP-A active l'expression du récepteur scavenger A par les macrophages, ce qui se traduit par une augmentation de la phagocytose de *Streptococcus pneumoniae* (Kuronuma *et al.*, 2004). De la même manière, il active l'expression du récepteur au mannose et il en résulte une augmentation de la phagocytose de *Mycobacterium tuberculosis* et *M. avium* (Beharka *et al.*, 2002; Kudo *et al.*, 2004). SP-A est également capable d'augmenter l'expression du récepteur CR3 sur la surface des macrophages alvéolaires (Gil *et al.*, 2009). En effet, les macrophages alvéolaires des souris déficientes en SP-A voient leur expression de récepteurs CR3 augmentée comparé aux souris

sauvages. De plus, SP-A est capable de se fixer sur ce récepteur et ainsi il joue le rôle d'opsonine dans la phagocytose d'*Haemophilus influenzae*. La caractérisation des domaines impliqués dans l'interaction avec le récepteur CR3 révèle que le groupement oligosaccharidique lié au N-terminal est critique, ainsi que, de manière moins importante, le domaine collagène.

3.2.5.2. Modulateur de l'immunité

Des études récentes suggèrent que SP-A pourrait avoir un rôle dans l'immunité innée et adaptative en modulant, en particulier, les fonctions des cellules dendritiques (CD) et des cellules T. Au niveau des poumons, les CD sont présentes au niveau de l'épithélium respiratoire, du parenchyme et dans l'espace alvéolaire, où elles sont les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) les plus répandues. Lorsqu'elles ne sont pas activées, elles présentent une activité phagocytaire, tandis qu'une fois maturées, après un signal comme le LPS ou des cytokines, elles jouent leur rôle de CPA pour les cellules T (Havenith *et al.*, 1993; Holt *et al.*, 1988). Le SP-A module l'activité des CD en inhibant leur maturation mais également leur activité de phagocytes et de chimiotactisme (Brinker *et al.*, 2003). De plus, il agit également sur les cellules T en inhibant leur prolifération via l'inhibition de la production d'IL-2 (Borron *et al.*, 1996). La régulation de ces lymphocytes ferait appel à des interactions via le domaine collagène ainsi que le domaine CRD (Borron *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1998). Cet effet est corrélé par une étude sur des souris transgénique où SP-A est délété, qui montre une augmentation du nombre de lymphocytes B et T dans les poumons (LeVine *et al.*, 2002).

De plus, le SP-A est capable de moduler la production de ROS et d'espèces réactives de l'azote par l'intermédiaire des cellules phagocytaires. Ainsi, SP-A favorise l'activité antimycoplasme des macrophages alvéolaires par la production de peroxy-nitrique (Hickman-Davis *et al.*, 1999) ou bien encore la production d'oxyde nitrique pour l'élimination du BCG (Weikert *et al.*, 2000). A l'inverse, lors d'une infection par le virus respiratoire syncytial ou *Streptococcus* du groupe B, SP-A provoque la diminution des ROS (Hussain, 2004). SP-A joue également un rôle important dans la réponse allergique car il peut à la fois fixer les pollens, les allergènes, ainsi que les acariens, et empêcher la fixation des IgE aux pathogènes (pour revue : Wang & Reid, 2007). En effet, SP-A est capable de fixer *Aspergillus fumigatus*, un pathogène fongique opportuniste causant des allergies, et d'augmenter son élimination par les neutrophiles et les macrophages (Madan *et al.*, 1997a). De plus, il est capable de neutraliser les allergènes de ce pathogène, ainsi que ceux d'acariens, comme Der-p, et cela

permet d'inhiber la libération d'histamine par les basophiles et les mastocytes, dépendante de l'interaction des IgE avec ces molécules allergènes (Madan *et al.*, 1997b; Wang *et al.*, 1998).

3.2.5.3. Modulation de l'inflammation

Les effets immunomodulateurs du SP-A vis-à-vis des cellules immunitaires peuvent être contradictoires avec des effets pro- ou anti-inflammatoires. En effet, une étude sur les macrophages illustre ce paradoxe qui dépend de l'état infectieux (Gardai *et al.*, 2003). En l'absence de pathogène, le domaine CRD du SP-A étant libre, celui-ci se fixerait sur le récepteur SIRP α entraînant un signal inhibiteur sur les voies de transduction ayant pour conséquence un effet anti-inflammatoire. Par contre, en présence de pathogènes ou de débris cellulaires, accaparant le domaine CRD, SP-A par son domaine collagène pourrait activer les cellules immunitaires via une interaction avec le complexe CD91/calréticuline engendrant un effet pro-inflammatoire.

En outre, des études avec du LPS, élément constitutif des bactéries à Gram négatif, ainsi que du peptidoglycane (PGN) des bactéries à Gram positif, mettent en évidence cette double fonction du SP-A. En effet, le SP-A inhibe la production de TNF- α en présence de S-LPS, qui n'est pas un ligand du SP-A, par les macrophages alvéolaires, ce qui démontre un effet anti-inflammatoire (Sano *et al.*, 1999). Cet effet est également obtenu juste par pré-incubation de SP-A avec les cellules, puis lavage, avant la mise en contact avec le S-LPS, montrant que l'interaction du SP-A avec les macrophages altère bien la réponse cellulaire au LPS. Des résultats similaires sont obtenus avec du PGN qui comme le S-LPS n'est pas un ligand du SP-A (Murakami *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2003). L'inhibition de la reconnaissance de ces éléments membranaires serait en particulier due à l'interaction du SP-A avec les récepteurs TLR-2 et TLR-4 (*Toll-like receptor*) à la surface des cellules (Murakami *et al.*, 2002; Yamada *et al.*, 2006). Ces données suggèrent que le SP-A a bien un effet anti-inflammatoire lorsque les éléments infectieux ne sont pas des ligands du SP-A. D'autres expériences avec des souris déficientes révèlent une augmentation de l'inflammation après instillation de LPS comparé aux souris sauvages, et cette inflammation est diminuée lorsque le LPS est co-administré avec du SP-A (Borron *et al.*, 2000). SP-A favorise également l'élimination des cellules apoptotiques ainsi que de l'ADN, ce qui représente un effet anti-inflammatoire très important (Palaniyar *et al.*, 2004; Schagat *et al.*, 2001). En effet, la présence de fragment d'ADN libre ainsi que les cellules apoptiques sont des promoteurs de la réponse inflammatoire.

Par contre, le SP-A peut également favoriser l'inflammation. En effet, en présence de R-LPS, qui est un ligand du SP-A, la sécrétion par les macrophages de TNF- α est inchangée, voire augmentée (Sano *et al.*, 1999). Une surproduction de TNF- α et d'oxyde nitrique est observée lors de l'incubation de macrophages avec le BCG ou des mycoplasmes, en présence de SP-A (Hickman-Davis *et al.*, 1999; Weikert *et al.*, 2000). De plus, SP-A joue un rôle chimiotactique vis-à-vis des neutrophiles et des macrophages (Wang *et al.*, 1998; Wright & Youmans, 1993).

Ainsi, d'après toutes les études *in vitro* et *in vivo*, SP-A peut avoir aussi bien un rôle pro-inflammatoire qu'anti-inflammatoire et cela serait dépendant de plusieurs paramètres : i/ la structure de la collectine et en particulier son degré de polymérisation, ii/ la nature, la quantité et la virulence du pathogène, et iii/ l'état d'activation des cellules de l'immunité, et en particulier la nature des récepteurs de surface sur celles-ci (Haagsman *et al.*, 2008; Sano & Kuroki, 2005).

Il est à noter que SP-A serait potentiellement impliqué dans le phénomène de parturition via la mise en place d'une réponse inflammatoire (Romero *et al.*, 1988). En effet, SP-A est retrouvé dans le liquide amniotique dans les trois derniers mois de gestation, chez les souris comme chez les humains, et représente un indicateur de maturation des poumons (Mendelson & Condon, 2005). De plus, les études sur les souris révèlent que l'injection de SP-A dans l'utérus entraîne la migration de macrophages, l'activation de la voie NF- κ B et initie le travail (Condon *et al.*, 2004). A l'inverse, le travail est retardé en présence d'anticorps dirigé contre SP-A ou avec des inhibiteurs de NF- κ B. Cependant, l'implication réelle du SP-A reste à déterminer et plusieurs phénomènes observés sont à élucider, mais ces études reflètent un nouveau rôle potentiel de cette protéine multifonctionnelle (Garcia-Verdugo *et al.*, 2010).

En conclusion, SPA et SP-D sont des modulateurs de la réponse immunitaire innée ainsi qu'adaptative, et de la réponse inflammatoire (Figure 21) (Wright, 2005). Ils permettent une régulation fine de la réponse immunitaire en protégeant l'épithélium alvéolaire des dommages causés par une inflammation excessive. Pour cela, ils agissent à la fois sur les pathogènes et les cellules de l'immunité permettant d'établir un équilibre entre la réponse inflammatoire nécessaire à l'élimination des pathogènes et l'inhibition d'une réaction excessive lors d'infection faible.

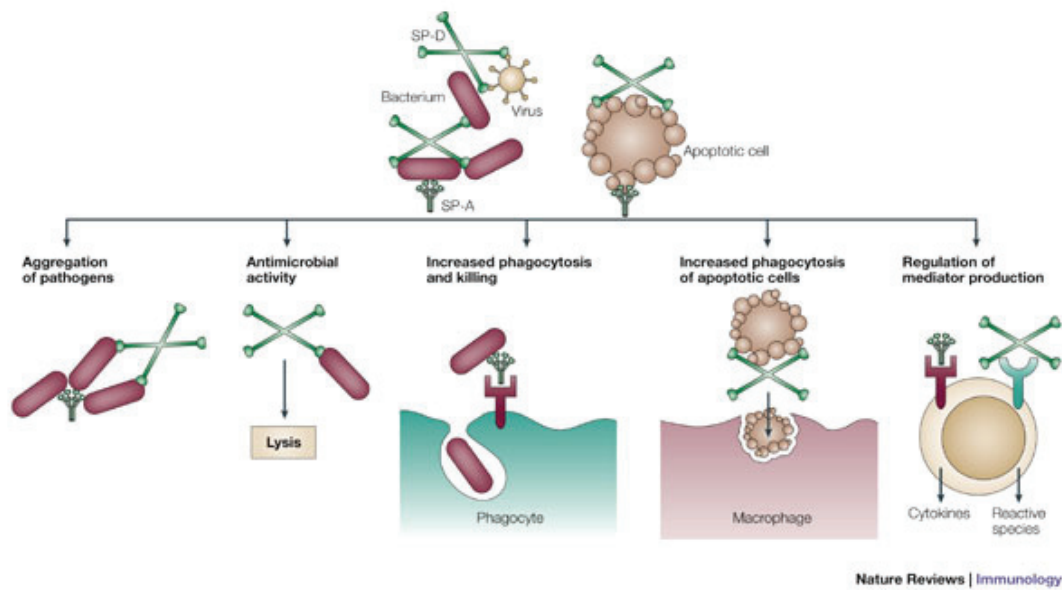


Figure 21 : Principaux rôles de SP-A et SP-D dans l'immunité

SP-A et SP-D sont impliqués dans 1/ l'agglutination des pathogènes, 2/ la lyse des pathogènes, 3/ la phagocytose des pathogènes et des cellules apoptotiques (opsonisation), 4/ la sécrétion de médiateurs de l'inflammation par les cellules immunitaires. (Wright, 2005)

4. Cathepsines, immunité innée et mucoviscidose

Une altération de la composition en surfactant est observée dans de nombreuses pathologies touchant les poumons (Griese, 1999). Dans le cas de la mucoviscidose, cette altération est d'autant plus importante lorsque les patients présentent une forte inflammation et sont infectés (Griese *et al.*, 2004). Les enzymes responsables de la diminution des constituants du surfactant pulmonaire identifiées à l'heure actuelle sont d'origine microbienne ou cellulaire, avec en particulier les protéases sécrétées par *Pseudomonas aeruginosa* et les neutrophiles (Garcia-Verdugo *et al.*, 2010). En outre, les cathepsines à cystéine, qui sont présentes et actives dans les LLBA des patients CF, sont capables de réguler des peptides et des protéines antimicrobiens (pour revue : Kasabova *et al.*, 2011). Elles favorisent également la dérégulation des protéases de neutrophiles.

4.1. Surfactant dans la mucoviscidose

4.1.1. Les lipides

Dans le cas de la mucoviscidose, les études révèlent un changement du contenu et de la composition en lipides, et en particulier des phospholipides. Une des premières études réalisées en 1978 (Sahu & Lynn, 1978) montre une augmentation en PE et PG, tandis que le niveau de saturation des phospholipides participant activement à la tension de surface est diminué. Des résultats similaires sont obtenus par la suite avec une diminution de la proportion en phospholipides qui est associée à une augmentation de la tension de surface (Gilljam *et al.*, 1988; Griese *et al.*, 1997; Mander *et al.*, 2002; Postle *et al.*, 1999). Cette corrélation entre le niveau de phospholipides, leur saturation, et la tension de surface reflète l'importance de ces lipides, avec en particulier le DPPC. Cependant, l'étude de Hull et de ses collaborateurs ne fait état d'aucune différence significative entre des patients non CF et CF non infectés, contrairement aux patients CF infectés (Hull *et al.*, 1997). En effet, une altération de la composition en lipides n'est observée que chez les patients CF colonisés ce qui laisse à penser que l'altération de la composition du surfactant est dépendante de l'état inflammatoire et infectieux des patients. Une des explications de cette observation serait

l'implication de phospholipases, d'origine bactérienne par exemple, qui ont été décrites comme inhibiteurs des fonctions du surfactant (Holm *et al.*, 1991).

4.1.2. Les protéines du surfactant pulmonaire

Les observations, bien que partiellement contradictoires, rapportent de manière générale et consensuelle, une diminution des protéines du surfactant pulmonaire, et en particulier du SP-A. En effet, mis à part l'étude de Hull et de ses collaborateurs montrant que SP-A est augmenté (Hull *et al.*, 1997), les autres études révèlent une diminution ou une altération du SP-A (Postle *et al.*, 1999). De plus, cette diminution en SP-A et en SP-D, est associée à l'état inflammatoire et infectieux des patients (Griese *et al.*, 2004; Noah *et al.*, 2003). Outre un déficit quantitatif du SP-A, celui-ci est également retrouvé dégradé, avec la présence de fragments de dégradation, ce qui laisse à penser qu'une activité protéolytique pourrait être impliqué dans le défaut de SP-A et de SP-D observé chez les patients CF (von Bredow *et al.*, 2001). Cette étude montre également une altération de la capacité du SP-A à former des polymères, ce qui suggère un défaut dans ses propriétés biologiques dépendantes de ce phénomène. Pour ce qui est de SP-C, sa concentration augmente et cela peut être expliqué comme étant un phénomène de compensation pour lutter contre la tension de surface (Griese *et al.*, 2004). Par contre la quantité de SP-B est inchangée par rapport aux patients sains, voire diminuée dans le cas des patients CF infectés (Hull *et al.*, 1997).

4.2. Protéines du surfactant et protéolyse

4.2.1. Protéases de *Pseudomonas aeruginosa*

Etant donné l'importance du pathogène *Pseudomonas aeruginosa* chez les patients CF, la communauté scientifique s'est intéressée au potentiel protéolytique de ce pathogène vis-à-vis des constituants du surfactant pulmonaire. Il a ainsi été montré que *P. aeruginosa* dégrade à la fois les phospholipides et les protéines du surfactant (Beatty *et al.*, 2005). En effet, l'incubation de LA avec le surnageant de culture de ce pathogène révèle que les enzymes sécrétées dégradent les phospholipides, SP-A et SP-B, entraînant la conversion des LA en PA. La dégradation des phospholipides comme DPPC, PC, PG serait due à l'action de lipases et de phospholipases sécrétées, et en particulier la phospholipase C. Les protéases impliquées dans la dégradation des protéines de surfactant comme SP-A et SP-D sont l'élastase de *P.*

aeruginosa (métalloprotéase) et la protéase IV (protéase à sérine) (Alcorn & Wright, 2004; Malloy *et al.*, 2005; Mariencheck *et al.*, 2003). La protéase IV dégrade SP-A, SP-B et SP-D, inhibant ainsi les propriétés d'agglutination et d'opsonisation des collectines, et diminue les propriétés tensio-actives du surfactant (Malloy *et al.*, 2005). Quant à l'élastase, elle dégrade également SP-A et SP-D, avec un clivage du SP-D dans son domaine CRD, à proximité des résidus impliqués dans la coordination du calcium, ne permettant plus à celle-ci d'agglutiner les pathogènes comme *P. aeruginosa* et *Escherichia coli*, et les effets sur la tension de surface sont similaires à la protéase IV (Alcorn & Wright, 2004; Mariencheck *et al.*, 2003). Ces études révèlent le rôle critique de ce pathogène dans le défaut en collectines et l'altération des propriétés tensio-actives du surfactant chez les patients CF, participant ainsi à la diminution de la réponse immune et à l'exacerbation de la réponse inflammatoire. Cependant, l'étude de Mariencheck montrent que SP-A est dégradé dans les LLBA de patients qui ne sont pas colonisés par ce pathogène, ce qui suggère l'implication d'autres protéases dans la génération des fragments observés.

4.2.2. Protéases à sérine du neutrophile

Au cours de la mucoviscidose, un recrutement accru de leucocytes est observé avec la mise en place de la réponse immunitaire et de l'inflammation, avec en particulier une forte proportion de neutrophiles qui sécrètent trois protéases à sérine : l'élastase, la protéinase 3 et la cathepsine G (Campbell *et al.*, 1989; Korkmaz *et al.*, 2010). Outre leurs rôles dans la dégradation des tissus pulmonaires, elles sont capables de dégrader les collectines du surfactant pulmonaire (Liau *et al.*, 1996). En effet, SP-A est dégradé par ces trois protéases à sérine comme le montre la dégradation de SP-A exogène, et endogène, dans des LLBA de patients CF ; dégradation inhibée en présence d'inhibiteurs spécifiques de ces protéases (Rubio *et al.*, 2004). Ces résultats soutiennent l'étude utilisant de l' α_1 -antitrypsine (ou α_1 -PI pour *alpha 1-protease inhibitor*) par inhalation chez des patients CF, qui montre une réduction de la dégradation du SP-A dans les LLBA (Griese *et al.*, 2001). En ce qui concerne SP-D, ces protéases clivent cette collectine dans la région conservée de reconnaissance des sucres du domaine CRD, entraînant la perte des propriétés lectines du SP-D, avec l'inhibition de l'agglutination bactérienne et de sa fixation aux sucres (Griese *et al.*, 2003; Hirche *et al.*, 2004). L'élastase se révèle avoir le plus fort potentiel protéolytique vis-à-vis du SP-D dans un contexte inflammatoire chez les patients CF, suivi de la protéinase 3 puis de la cathepsine G (Cooley *et al.*, 2008). Il est à noter qu'en présence d'une concentration physiologique en

calcium, l'hydrolyse est ralentie avec des sites de clivage différents, voire même inhibée, ce qui est en corrélation directe avec les changements structuraux engendrés par la fixation de cet ion au niveau du domaine CRD (Duvoix *et al.*, 2011; McCormack *et al.*, 1994a). Ces études suggèrent que les protéases à sérine du neutrophile participent à la diminution des collectines dans les pathologies inflammatoires pulmonaires, et en particulier dans la mucoviscidose étant donné leur abondance.

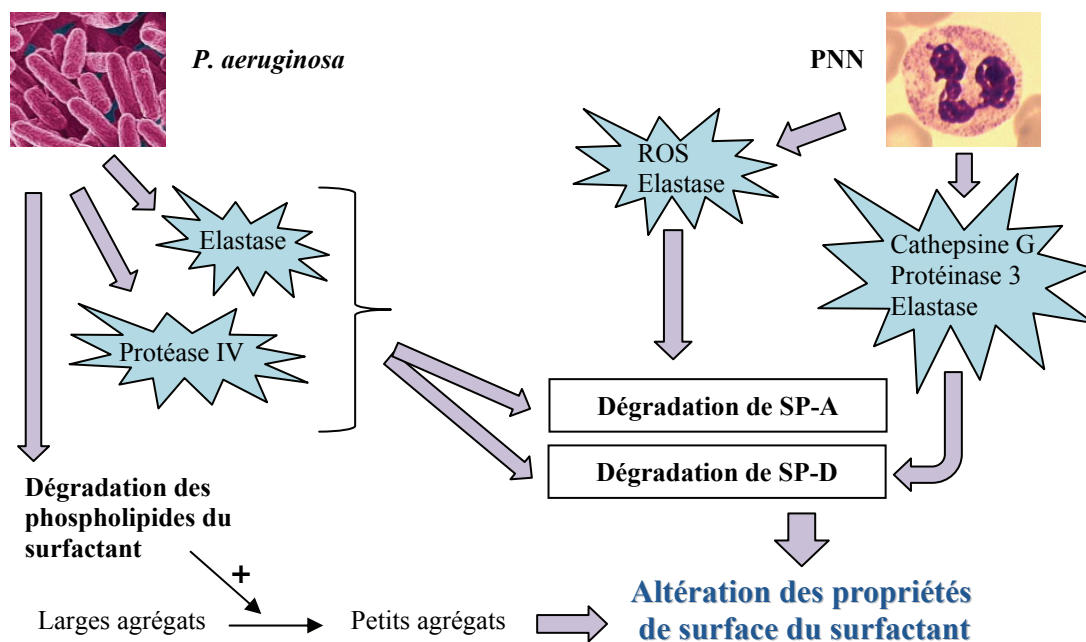


Figure 22 : Influence de *P. aeruginosa* et des neutrophiles sur le surfactant pulmonaire
Impacts des protéases de *P. aeruginosa* et des neutrophiles (PNN), ainsi que des espèces réactives de l'oxygène (ROS), sur les constituants du surfactant. (D'après Faure *et al.*, 2006)

4.2.3. Allergènes d'acariens

Outre les enzymes impliquées de manière directe dans la mucoviscidose, des protéases d'allergènes avec une activité cathepsine ont été mises en évidence comme pouvant cliver les collectines SP-A et SP-D (Deb *et al.*, 2007). En effet, deux souches d'acariens *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) et *Dermatophagoides farinae* (Der f), responsables d'asthmes allergiques, sécrètent des protéases à cystéine, Der p 1 et Der f 1 respectivement (famille C1, sous famille A), qui peuvent être liées par les collectines via le domaine CRD. Cependant, ces deux protéases sont également capables de dégrader SP-A et SP-D, ce qui a pour conséquence la perte de reconnaissance des sucres et de leurs propriétés d'agglutination bactérienne. Cette capacité pourrait favoriser l'allergénicité de ces deux protéases. Cette étude

met en évidence que d'autres classes de protéases, autres que les protéases à sérine, pourrait être impliquées dans la dégradation des collectines du surfactant.

4.3. Régulation physiologique des protéines hydrophobes par les cathepsines

Les cathepsines à cystéine sont impliquées dans la maturation des protéines hydrophobes du surfactant pulmonaire SP-B et SP-C (pour revue : Kasabova *et al.*, 2011). En effet, la maturation de SP-B et de SP-C est inhibée en présence de l'inhibiteur spécifique des cathepsines, le E-64 (Guttentag *et al.*, 2003). La cathepsine H serait en particulier impliquée, d'après les mesures d'activités réalisées sur les cellules de type II et les expériences d'immunolocalisation, avec la protéase aspartique, la napsine A (Ueno *et al.*, 2004). Cette hypothèse est soutenue par la relation directe entre l'activité cathepsine H et la quantité de SP-B suite à l'action d'IFN- γ , celui-ci entraînant l'inhibition des deux protéines (Ito & Mason, 2010). Cette cathepsine est également impliquée dans la maturation de SP-C, où elle participerait au clivage du précurseur côté N-terminal, avec d'autres protéases qui ne sont pas encore identifiées (Brasch *et al.*, 2002).

4.4. Cathepsines et immunité

Outre leur rôle dans la réponse immunitaire et inflammatoire déjà cité précédemment (partie 2.3) comme l'apoptose, les cathepsines agissent également sur d'autres acteurs cellulaires ou circulants. Par exemple, elles régulent la voie de signalisation des récepteurs TLR, en particulier du TLR-9 (Asagiri *et al.*, 2008). La déficience en cathepsine K entraîne la perte de la réponse à l'ADN par les CD dépendante de ce récepteur. Par ailleurs, les cathepsines B, L, S et F seraient impliquées dans cette voie (Matsumoto *et al.*, 2008). De plus, elles activeraient TLR-9 et TLR-7 par clivage de leur ectodomaine au niveau des endolysosomes, permettant à ces récepteurs de lier leurs ligands (Ewald *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2008). Elles modulent également les cytokines avec le clivage de l'IL-8 par la cathepsine L, qui augmente son activité, ou bien encore la cathepsine B, qui participe à la maturation et à la sécrétion du TNF- α (Ha *et al.*, 2008; Ohashi *et al.*, 2003). Il est à noter que le TNF- α à son tour, avec l'IL-1, favorise l'activité des cathepsines B et S dans le processus de présentation des antigènes par le CMH de classe II dans les CD (Fiebiger *et al.*, 2001). Pour finir, une étude récente révèle leur implication dans la régulation de l'activité de la chémérine, une protéine

aux propriétés chimiotactiques et antibactériennes (Kulig *et al.*, 2011). En effet, la chémérine est clivée par les cathepsines K et L ce qui entraîne l'activation de ses propriétés de chimiotactisme vis-à-vis des cellules CD. De plus, ce clivage génère une chémérine tronquée aux pouvoirs antibactériens accrus contre la famille des *Enterobacteriaceae* comme *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*.

4.5. Cathepsines dans la mucoviscidose

L'implication potentielle des cathepsines à cystéine dans la mucoviscidose a été mise en évidence par McElvaney et ses collaborateurs. Ils ont décrit une activité cathepsine élevée, représentée par les cathepsines B, H, L et S, dans les LLBA des patients CF comparés aux contrôles, où cette activité est faible voire non détectable (Taggart *et al.*, 2003). De plus, une étude récente suggère également que les cathepsines B et S sont présentes, et que leur activité est corrélée avec le niveau d'élastase et d'IL-8 (Martin *et al.*, 2010), bien que cela soit discuté et en partie contesté (Grasemann, 2010). En outre, il a été montré que les fluides au niveau de l'épithélium alvéolaire sont acidifiés chez les patients CF et cela évolue avec l'exacerbation de l'inflammation, l'acidification pouvant approcher pH 5 (Tate *et al.*, 2002). Cette étude soutient ainsi l'hypothèse de l'implication des cathepsines étant donné que leur pH optimal d'activité est à environ 5,5.

De plus, les cathepsines sont capables d'hydrolyser et d'inactiver des peptides et des protéines antimicrobiens au niveau de l'épithélium respiratoire des patients CF. Les cathepsines B, L et S dégradent ainsi les β -défensines 2 et 3 qui sont des peptides antimicrobiens (Taggart *et al.*, 2003). Le clivage a pour conséquence la perte des propriétés antimicrobiennes, reflété dans cette étude vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*. Ces cathepsines inactivent également la lactoferrine qui entraîne la perte de clairance de ce même pathogène et favorise la formation de biofilms par celui-ci (Rogan *et al.*, 2004). Par ailleurs, les cathepsines B, L et S sont capables de dégrader et d'inactiver le SLPI, inhibiteur de protéases à sérine, qui possède des propriétés antimicrobiennes et anti-inflammatoires (Taggart *et al.*, 2001). Enfin, la cathepsine L peut inactiver l' α_1 -antitrypsine (Johnson *et al.*, 1986) et le SLPI ; ce dernier représentant les inhibiteurs majoritaires des voies aériennes supérieures et inférieures. Ainsi, les cathepsines, en inactivant ces inhibiteurs, participeraient à la dérégulation de l'activité protéolytique des protéases à sérine, protéases qui représentent

un arsenal protéolytique délétère dans la physiopathologie de la mucoviscidose. Par conséquent, elles favorisent l'exacerbation de l'inflammation et l'infection bactérienne.

II- Travaux personnels

Dans la physiopathologie de la mucoviscidose, les atteintes pulmonaires représentent la principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients. Les altérations pulmonaires sont la résultante d'une inflammation chronique associée à des infections bactériennes, en particulier à *Pseudomonas aeruginosa*. Ces deux paramètres impliquent la production par les cellules de l'immunité d'enzymes protéolytiques, indispensables à la réponse inflammatoire et à sa résolution. Cependant, dans le cas de nombreuses pathologies inflammatoires, on observe une exacerbation de la réponse avec une dérégulation de ces protéases qui ont alors un rôle délétère. Elles sont ainsi impliquées dans la destruction des tissus pulmonaires ou bien encore dans le défaut des défenses anti-infectieuses, favorisant la colonisation pulmonaire et induisant une perte des capacités respiratoires.

Outre l'implication des protéases à sérine pour lesquelles nous disposons de nombreuses données, les études grandissantes sur le rôle des cathepsines à cystéine dans ces pathologies révèlent leur importance physiopathologique dans les processus inflammatoires et immunitaires (pour revue : Kasabova *et al.*, 2011). Elles sont en effet impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire et de la membrane basale. Elles sont également capables d'inactiver des peptides et des protéines antibactériens ayant une conséquence directe sur les défenses anti-infectieuses, favorisant l'infection et par conséquent l'exacerbation de la réponse inflammatoire. Dans le cas de la mucoviscidose, les études révèlent la présence de cathepsines actives et elles ont été proposées comme marqueurs de colonisation par *Pseudomonas aeruginosa*. Parmi les acteurs de l'immunité innée au niveau pulmonaire, les collectines du surfactant jouent un rôle important avec en particulier SP-A qui est la plus abondante. Cependant, on observe un défaut en SP-A chez les patients CF ainsi que des fragments de dégradation. A l'heure actuelle, les protéases proposées pour être impliquées dans l'altération du SP-A sont celles de *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que les protéases à sérine du neutrophile. Cependant, l'action possible d'autres protéases reste à évaluer.

Dans ce contexte, la présente étude a consisté à examiner l'implication des cathepsines à cystéine dans la physiopathologie de la maladie et cela selon trois axes. Dans un premier temps, nous avons réalisé une étude quantitative des cathepsines à cystéine chez les patients CF, analysé la balance protéases / inhibiteurs et examiné l'influence de la colonisation par *Pseudomonas aeruginosa*. Dans un deuxième temps, nous avons analysé le mécanisme d'inhibition de la cathepsine B, la cathepsine la plus abondante, par les kininogènes, et par conséquent l'implication de cette cathepsine dans le déséquilibre protéolytique observé dans

ces pathologies inflammatoires. Pour finir, nous avons examiné le rôle des cathepsines à cystéine et plus particulièrement celui de la cathepsine S dans le défaut et la dégradation de la protéine du surfactant SP-A chez les patients CF.

1. Balance cathepsines/inhibiteurs dans la mucoviscidose

Article 1: Human cysteine cathepsins are not reliable markers of infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis
C. Naudin, A. Joulin-Giet, G. Couetdic, P. Plésiat, A. Szymanska, E. Gorna, F. Gauthier, F. Kasprzykowski, F. Lecaille & G. Lalmanach (2011)
PLoS ONE, 6(9): e25577. doi:10.1371/journal.pone.0025577

La mucoviscidose est caractérisée par une inflammation chronique des voies respiratoires délétère, due en partie à la présence au niveau de l'épithélium d'enzymes protéolytiques et d'un dérèglement de la balance protéases / antiprotéases. Associées à l'inflammation, les patients souffrent également d'infections pulmonaires, en particulier à *Pseudomonas aeruginosa*. Contrairement aux protéases à sérine du neutrophile (élastase, cathepsine G et protéinase 3), l'implication des cathepsines à cystéine dans la physiopathologie de la mucoviscidose est peu documentée. Cependant, les études montrent que l'activité de la cathepsine B est très élevée dans les LLBA des patients CF par comparaison aux patients contrôles (Taggart *et al.*, 2003). De plus, les cathepsines seraient susceptibles d'exacerber l'inflammation et l'infection en inactivant des peptides et des protéines antimicrobiens (Rogan *et al.*, 2004; Taggart *et al.*, 2003, 2001). En effet, elles sont capables d'inactiver le SLPI (*secretory leukocyte protease inhibitor*), les β -défensines 2 et 3, et la lactoferrine. Elles sont également proposées comme marqueurs de l'inflammation à côté de l'élastase et de l'IL-8 (Martin *et al.*, 2010). En particulier, les cathepsines B et S seraient corrélées positivement à ces deux marqueurs.

Lors de cette étude, nous avons quantifié l'activité des cathepsines à cystéine (principalement les cathepsines B, H, K, L et S), ainsi que leurs inhibiteurs, présents dans les expectorations de patients CF. Comme d'autres pathologies inflammatoires, nous avons mis en évidence que les kininogènes sont dégradés et qu'il y a un déséquilibre de la balance cathepsines / inhibiteurs en faveur de l'activité protéolytique des cathepsines. Nous observons également une différence significative de l'activité de l'élastase humaine entre les patients colonisés et non colonisés, ce qui confirme qu'elle représente un marqueur de colonisation par

Pseudomonas aeruginosa. Cependant, contrairement à l'élastase humaine, l'activité des cathepsines n'est pas corrélée à l'infection des patients par ce pathogène. Les cathepsines à cystéine ne sont donc pas des marqueurs de colonisation par *Pseudomonas aeruginosa* contrairement à ce qui avait été proposé dans une étude précédente (Martin *et al.*, 2010).

Ainsi, la présence des cathepsines à cystéine actives et le fait qu'elles soient sous-régulées par leurs inhibiteurs, supporte l'idée qu'elles peuvent participer à la physiopathologie de la mucoviscidose. Comme dans d'autres pathologies inflammatoires, elles pourraient contribuer à la dégradation et au remodelage de la matrice extracellulaire. Elles sont également capables de dégrader des protéines et des peptides antibactériens ce qui favorise l'infection par les pathogènes. Les cathepsines à cystéine pourraient ainsi participer à l'exacerbation de la réponse inflammatoire et altérer les défenses immunitaires favorisant l'infection. Par conséquent, l'étude de l'implication de ces protéases dans la mucoviscidose, comme dans d'autres pathologies, est primordiale car elles pourraient représenter une cible thérapeutique alternative, à côté des protéases à sérine.

Human Cysteine Cathepsins Are Not Reliable Markers of Infection by *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis

Clément Naudin¹, Alix Joulin-Giet¹, Gérard Couetdic², Patrick Plésiat², Aneta Szymanska³, Emilia Gorna³, Francis Gauthier¹, Franciszek Kasprzykowski³, Fabien Lecaille¹, Gilles Lalmanach^{1*}

1 Inserm U618, Université François Rabelais, Protéases et Vectorisation Pulmonaires, Tours, France, **2** Laboratoire de Bactériologie, CHU Jean Minjoz, Besançon, France, **3** Faculty of Chemistry, Department of Medicinal Chemistry, University of Gdansk, Sobieskiego, Gdansk, Poland

Abstract

Cysteine cathepsins have emerged as new players in inflammatory lung disorders. Their activities are dramatically increased in the sputum of cystic fibrosis (CF) patients, suggesting that they are involved in the pathophysiology of CF. We have characterized the cathepsins in CF expectorations and evaluated their use as markers of colonization by *Pseudomonas aeruginosa*. The concentrations of active cathepsins B, H, K, L and S were the same in *P. aeruginosa*-positive (19 Ps+) and *P. aeruginosa*-negative (6 Ps−) samples, unlike those of human neutrophil elastase. Also the cathepsin inhibitory potential and the cathepsins/cathepsin inhibitors imbalance remained unchanged and similar (~2-fold) in the Ps+ and Ps− groups ($p < 0.001$), which correlated with the breakdown of their circulating cystatin-like inhibitors (kininogens). Procathepsins, which may be activated autocatalytically, are a potential proteolytic reservoir. Immunoblotting and active-site labeling identified the double-chain cathepsin B, the major cathepsin in CF sputum, as the main molecular form in both Ps+ and Ps− samples, despite the possible release of the ~31 kDa single-chain form from procathepsin B by sputum elastase. Thus, the hydrolytic activity of cysteine cathepsins was not correlated with bacterial colonization, indicating that cathepsins, unlike human neutrophil elastase, are not suitable markers of *P. aeruginosa* infection.

Citation: Naudin C, Joulin-Giet A, Couetdic G, Plésiat P, Szymanska A, et al. (2011) Human Cysteine Cathepsins Are Not Reliable Markers of Infection by *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. PLoS ONE 6(9): e25577. doi:10.1371/journal.pone.0025577

Editor: Stefan Wölfl, Universität Heidelberg, Germany

Received: June 6, 2011; **Accepted:** September 7, 2011; **Published:** September 28, 2011

Copyright: © 2011 Naudin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: The French cystic fibrosis association "Vaincre la Mucoviscidose" provided financial support (VLM, France, Grant IC0810). CN is a recipient of a doctoral fellowship from VLM. This work was also supported by institutional funding from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: gilles.lalmanach@univ-tours.fr

Introduction

Cystic fibrosis is an inherited life-threatening disorder. It is associated with a mutation of the CF transmembrane glycoprotein that is involved in the transport of chloride ions [1,2]. This exocrinopathy mainly affects cells producing mucus, sweat and digestive fluids and causes severe lung damage and nutritional deficiencies. While palliative care is presently available for these patients, there is no effective cure [3]. The clinical manifestations of chronic inflammation of the respiratory epithelium (overproduction of mucus, persistent cough, wheezing, repeated lung and sinus infections), are mainly due to the release of proteolytic enzymes and the disruption of the protease-antiprotease balance. This leads to the degradation of lung tissues and the impairment of lung function. The involvement of serine proteases released from polymorphonuclear neutrophils (elastase, cathepsin G, protease 3) has been extensively studied [4,5] but the role of lung cysteine proteases (CPs, family C1) is less well documented [6]. The cysteine cathepsins B, H, L, K and S are involved in a variety of proteolytic processes, such as the turnover of endocytosed proteins, prohormone processing, MHC-II antigen presentation, and extracellular matrix and basal membrane degradation. They are also involved in diseases like tumor metastasis, osteoporosis, and rheumatoid arthritis [7,8]. Lung CPs are mainly produced by macrophages, fibroblasts and epithelial cells, while cathepsin H is

mainly found in type II pneumocytes [9,10]. Stimulated monocyte-derived macrophages can release the CPs that are found in the bronchoalveolar lavage fluids (BALFs) of smokers suffering from emphysema [11]. Active forms of cysteine cathepsins are also present in BAL fluids from patients suffering from infiltrative inflammatory disorders like sarcoidosis and alveolar proteinosis, and silicosis [12,13,14].

The hyperviscous mucus found in CF airways severely hinders effective phagocytosis by neutrophils and makes the lungs more susceptible to infection by *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Haemophilus influenzae*. While *S. aureus* is predominantly found in the early stages of colonization, *P. aeruginosa* is more resistant to antibiotics and soon becomes the main organism infecting CF lungs [15]. Cysteine cathepsins may be important in the pathophysiology of cystic fibrosis under these conditions [16]. The activity of cathepsin B is dramatically higher (~several 100-fold) in the bronchoalveolar lavage fluids of CF patients than in those of healthy patients [17]. This high proteolytic activity in CF lungs may contribute to the dysfunction of the inflammatory response and thus to local tissue damage [16]. Cathepsins may also exacerbate lung disease by weakening the host defenses by breaking down and inactivating SLPI (secretory leukocyte protease inhibitor), beta-defensins 2 and 3 (HBD-2 and HBD-3), and lactoferrin. The resulting loss of antimicrobial activity favors infection and colonization by opportunistic pathogens

[17,18,19]. The cathepsin activity in lavage fluid and sputum from CF patients whose lungs are colonized by *P. aeruginosa* is higher than reported for healthy controls [18]. A recent study detected both cathepsins B and S in CF sputum samples and proposed their use as markers of CF airway inflammation. The authors also suggested that the concentrations of both enzyme were correlated not only with each other but also with those of neutrophil elastase and IL-8 [20].

However, changes in the concentration and activity of CPs must be carefully examined before it can be stated that CPs may be markers of inflammation and/or bacterial infection and colonization [21]. Thus, the primary purpose of this study was to describe the enzymatically active forms of cysteine cathepsins in *P. aeruginosa*-positive (Ps+) and *P. aeruginosa*-negative (Ps-) CF expectorations using a single protocol. We then estimated the implications of the imbalance between CPs and their specific circulating inhibitors (kininogens, cystatins) by quantitative kinetic analysis based on protein content rather than sputum volume (or weight), as reported elsewhere. Finally, we analysed these data to determine whether CP activities were correlated with *P. aeruginosa* colonization and whether CPs may be useful new biological markers.

Materials and Methods

Substrates and synthetic inhibitors

Benzoyloxycarbonyl-Arg-Arg-7-amino-4-methyl coumarin (Z-Arg-Arg-AMC), H-Arg-AMC, Z-Gly-Pro-Arg-AMC and Z-Phe-Arg-AMC were purchased from Bachem (Weil am Rhein, Germany) and Z-Val-Leu-Arg-AMC from Enzyme System Products (Livermore, CA, USA), ortho-aminobenzoic acid (Abz)-Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Met-Arg-Arg-Gln-(3-NO₂-Tyrosine) came from GeneCust Europe (Dudelange, Luxembourg). L-3-carboxy-trans-2, 3-epoxy-propionyl-leucylamide-(4-guanido)-butane (E-64), PMSF, pepstatin A, EDTA, 4-(2-Aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSE; Pefabloc) and MMTS were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). N-(4-Biphenylacetyl)-S-methylcysteine-(D)-Arg-Phe-β-phenethylamide and N-(L-3-trans-propylcarbamoyloxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline (CA-074) were from Calbiochem (VWR International S.A.S., France). Morpholine urea-Leu- homophenylalanine-(vinylsulfonyl)benzene (Mu-Leu-Hph-VSPH) was kindly provided by Dr J.H. McKerrow (Department of Pathology, The Sandler Center for Basic Research in Parasitic Diseases, University of California, San Francisco, CA, USA). The biotinylated activity-based probe Biot-LVG-CHN₂ was synthesized as previously described [22]. DTT (DL-dithiotreitol) came from Bachem. All other reagents were of analytical grade.

Enzymes and inhibitors

Human cathepsins B, H, L and S were supplied by Calbiochem and human neutrophil elastase by BioCentrum (Krakow, Poland). High molecular weight kininogen (HMWK) was purchased from Calbiochem and cystatin C from R&D Systems Europe.

Ethics Statement

Sputum samples were collected on a routine basis from adult patients followed at the Teaching Hospital of Besançon (CHU Jean Minjoz, France) between 2009 and 2010. Enzymatic assays were performed in addition to routine bacteriological analyses when the volume of sputums was sufficient for both types of tests. Thus our protocol was considered as “waste” and we did not need a specific agreement from the local research ethics committee.

CF sputum samples

Twenty five sputum samples were collected (status reported as means ± S.D: years, 27.1(9.4); forced expiratory volume (FEV), 2.0 (0.9) L; body mass index (BMI), 20.4 (2.8)). Very soon after their recovery, the specimens were aseptically divided in two parts. One half was submitted to conventional bacteriological analyses to identify and quantify (colony-forming units per mL, cfu/mL) bacterial pathogens [23]. Sensitivity of detection of *P. aeruginosa* was ≥20 cfu/mL. Nineteen *P. aeruginosa*-positive samples and six *P. aeruginosa*-negative samples used as controls were included in the study. After thawing of the other half and to allow the accurate handling of clinical specimens, a preservative buffer (final concentrations: 100 mM sodium acetate, pH 5.0 plus the peptidase inhibitors 0.5 mM PMSF, 0.5 mM EDTA, 40 μM pepstatin A, and 1 mM MMTS) was instantly added to each CF sputum sample before it was centrifuged at 5000 g at 4°C for 10 min. The resulting cell-free supernatants were collected, aliquoted and frozen at -80°C. Alternatively a second buffer, 50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% NP40, 0.5 mM EDTA, 40 μM pepstatin A, and 1 mM E-64, was used for further analysis of elastase activity.

Immunoblotting

The goat anti-human cathepsin S was obtained from R&D Systems. Other primary polyclonal antibodies were raised in rabbits: anti-human cathepsin B (Calbiochem), anti-human cathepsin L (Calbiochem), anti-human cathepsin H (Fitzgerald, Concord, USA), anti-human cystatin C (Upstate, Lake Placid, USA) and anti-human low molecular weight kininogen [24]. The anti-human neutrophil elastase (HNE) was raised in rabbits using a 16-mer peptide corresponding to position 88–103 (IFEN-GYDPVNLLNDIV) of the proelastase sequence (numbering based on the sequence of prochymotrypsinogen [5]) coupled to ovalbumin for immunization. The IgG fraction obtained after ammonium sulfate precipitation was further purified by affinity chromatography on immobilized ovalbumin. Goat anti-rabbit and rabbit anti-goat IgG-peroxidase conjugates were supplied by Sigma-Aldrich. Bicinchoninic acid assays were used to determine the protein concentrations in supernatants (BCA protein assay kit, Interchim, Montluçon, France). Samples (30 μg protein) were diluted in Laemmli buffer under reducing conditions, boiled for 5 min, separated by SDS-PAGE on 15% gels (prestained molecular masses: Precision Plus Protein Standards, BioRad) and electroblotted onto nitrocellulose membranes. These membranes were incubated with the primary antibody (1:1000, in PBS, 0.1% Tween, 5% dried milk for 1 h at room temperature), then with the secondary IgG-peroxidase conjugate (1:5000) for 1 h at room temperature. Proteins were detected by chemiluminescence (ECL Plus Western Blotting Detection system, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). This protocol was used for *P. aeruginosa*-positive (Ps+) and *P. aeruginosa*-negative (Ps-) samples.

Labeling cysteine cathepsins with a cystatin-derived activity-based probe

Supernatants in buffer A (100 mM sodium acetate buffer pH 5.5 containing 5 mM DTT, 2 mM EDTA and 0.01% Brij 35) were incubated with a molar excess of Biot-LVG-CHN₂ (cathepsin:probe, 1:300) for 1 h at 37°C, as described previously [25]. In another set of experiments, we first incubated samples with unlabelled inhibitors (100 μM): E-64 (a broad-spectrum cathepsin inhibitor), CA-074 (a selective cathepsin B inhibitor) or Mu-Leu-Hph-VSPH (a selective cathepsin S inhibitor) before adding the biotinylated probe. Individual cathepsins B, H, L and S

were also used as control. Samples were then separated by SDS-PAGE on 12% gels under reducing conditions and transferred to nitrocellulose membranes by electroblotting. Free binding sites on the membranes were saturated by incubation with 3% BSA in PBS for 1 h at 37°C. The membranes were incubated with an extravidin-peroxidase conjugate (1:2500; Sigma-Aldrich) for 2 h at room temperature and the peroxidase activity was revealed by chemiluminescence (ECL Plus Western Blotting Detection system).

Hydrolysis of kininogens by CF sputum

Human HMWK (1.8 µg) was incubated in 100 mM sodium acetate buffer pH 5.5, 5 mM DTT, 2 mM EDTA, 0.01% Brij 35 with supernatant (corresponding to 10 µg protein) at 30°C for 5 hours. The mixture was then separated by 12.5% SDS-PAGE under reducing conditions and the separated products transferred to nitrocellulose membranes. Control mixtures contained E-64 and CA-074. HMWK hydrolysis was detected using a rabbit polyclonal anti-kininogen antibody [24].

Enzyme activity

A panel of AMC-derived fluorogenic substrates was used to measure the CP activities in supernatants diluted in buffer A. Samples (final volume per well: 200 µL) in 96-well Nunc microtiter plates (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France) were incubated at 37°C under gentle agitation, and their enzymatic activities were monitored continuously at $\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm (Gemini spectrofluorimeter, Molecular Devices, Saint-Grégoire, France). The protocol for quantifying active cathepsins in sputum supernatant was adapted from that used to titrate the CPs in BAL fluids [12,13]. Supernatant was incubated with concentrations of E-64 (0–100 nM) at 37°C for 30 min [26] in buffer A and the residual endopeptidase CP activity towards Z-Phe-Arg-AMC (20 µM) was then measured. Cathepsin B was titrated with CA-074 (0–100 nM) using Z-Arg-Arg-AMC as substrate (5 µM). Certain samples were incubated with CA-074 to inhibit cathepsin B before cathepsin K was titrated with E-64 using Z-Gly-Pro-Arg-AMC as substrate (50 µM), and cathepsin S using Z-Val-Leu-Arg-AMC as substrate (20 µM). The concentration of cathepsin L was deduced from the difference between the overall concentration of thiol-dependent endoproteases (i.e. cathepsins B+K+L+S) and the individual concentrations of cathepsins B, K and S. The aminopeptidase activity of cathepsin H was assayed using H-Arg-AMC (50 µM) as substrate. As cathepsin S is more stable than the other CPs at neutral pH, its specific activity was also assayed under mildly alkaline conditions [27]. Supernatant was incubated in 100 mM Na-phosphate buffer pH 7.4 (80 µL) for 1 hour at 37°C. An aliquot was then removed, diluted with buffer A and used to measure the residual cathepsin S activity at 37°C with Z-Val-Leu-Arg-AMC (20 µM) as the substrate. HNE activity was measured in the supernatant (1:50) using Abz-Ala-Pro-Glu-Glu-Ile-Met-Arg-Arg-Gln-(3-NO₂-Tyr) (10 µM) in buffer B (50 mM HEPES buffer pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% NP40).

Inhibitory potential of CF sputum

The procedure used to evaluate the inhibitory potential of supernatants was adapted from Assfalg-Machleidt et al. [28]. As most of the thiol-dependent endoprotease activities in sputum are those of cathepsins B and L (about 80%), their CP activities were blocked by incubating samples for 30 minutes with 0.2 µM CA-074 and 2 µM N-(4-Biphenylacetyl)-S-methylcysteine-(D)-Arg-Phe-β-phenethylamide. The inhibitory potential of CF sputum was deduced by adding increasing amounts of sputum superna-

tants (0–14 µL) to E-64 titrated papain, using Z-Phe-Arg-AMC as substrate (5 µM).

Zymogen activation in CF sputum

Diluted supernatants (20 µL, corresponding to 20 µg protein) were incubated in 800 µL 100 mM sodium acetate buffer pH 4.3, 4 mM DTT, 10 µg/ml dextran sulfate (Sigma-Aldrich), or buffer B at 37°C. Aliquots (2 µL) were removed at intervals (0–6 hours) and the CP activity in them was measured at 37°C, in buffer A, using Z-Phe-Arg-AMC (50 µM). E-64 was used as control. Samples were analyzed in parallel by Western blotting, as described above. Alternatively aliquots of supernatant were incubated in 50 mM HEPES (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.05% NP40 at 37°C to assay the elastase-dependent maturation of cathepsin B, using AEBSF (Pefabloc) as control.

Statistical analyses

Results were analyzed with the non-parametric Mann–Whitney U test; a P value < 0.05 is considered to be statistically significant.

Results and Discussion

Immunodetection and labeling of cysteine cathepsins and their inhibitors

The supernatants obtained by centrifuging the 25 *Pseudomonas aeruginosa*-positive and *Pseudomonas aeruginosa*-negative CF sputum samples were immediately buffered at pH 5.5 and stabilized (see the experimental section) to preserve cysteine cathepsins from inactivation at neutral pH and uncontrolled proteolysis. The median protein concentration was 3.74 mg/ml with interquartile ranges: IQR1, 3.31 mg/ml and IQR3, 4.50 mg/ml. We detected aminopeptidase cathepsin H in all sputum supernatants in addition to cathepsins B, L and S reported by Taggart et al. [17] (see representative samples in Figure 1A). However the activity profiles varied considerably, depending on the cysteine protease studied. Cathepsin L was mostly in its proform; the concentration of its mature form was below the limits of immunodetection under our experimental conditions. The full and/or partly processed proforms of cathepsin K were also detected, but mature cathepsin K was not (data not shown; the anti-cathepsin K antibody was a kind gift from Dr Dieter Brömme, University of British Columbia, Vancouver, Canada). Conversely, cathepsin H was detected mainly as its mature form. Both mature cathepsin S and procathepsin S were found (full or partially processed proform, depending on the sample). Mature cathepsin B was intensely stained (mainly as its double-chain form). But the zymogen of this most abundant and ubiquitous cathepsin was also found. However, Martin et al. [20] did not report finding procathepsin B. This discrepancy could be due to dissimilar storage conditions, since they diluted their expectorated sputum with an unbuffered saline without adequate inhibitors to stabilize them. There were small differences in the apparent molecular weights in sputum CPs and controls that reflect their degree of glycosylation. The enzyme/proenzyme profiles of sputum samples differed from those of BAL fluids from patients suffering from infiltrative inflammatory disorders [13], where cathepsins H and L were mostly detected as mature forms and cathepsins B, K and S as proforms. The enzyme profiles also differed from those of BAL fluids from silicosis patients, where only the mature forms of cathepsins B, H and L were immunodetected, while cathepsin H was the most abundant CP [12]. However, the immunochemical patterns of *P. aeruginosa*-positive and *P. aeruginosa*-negative samples were fairly similar for cathepsins and their endogenous inhibitors.

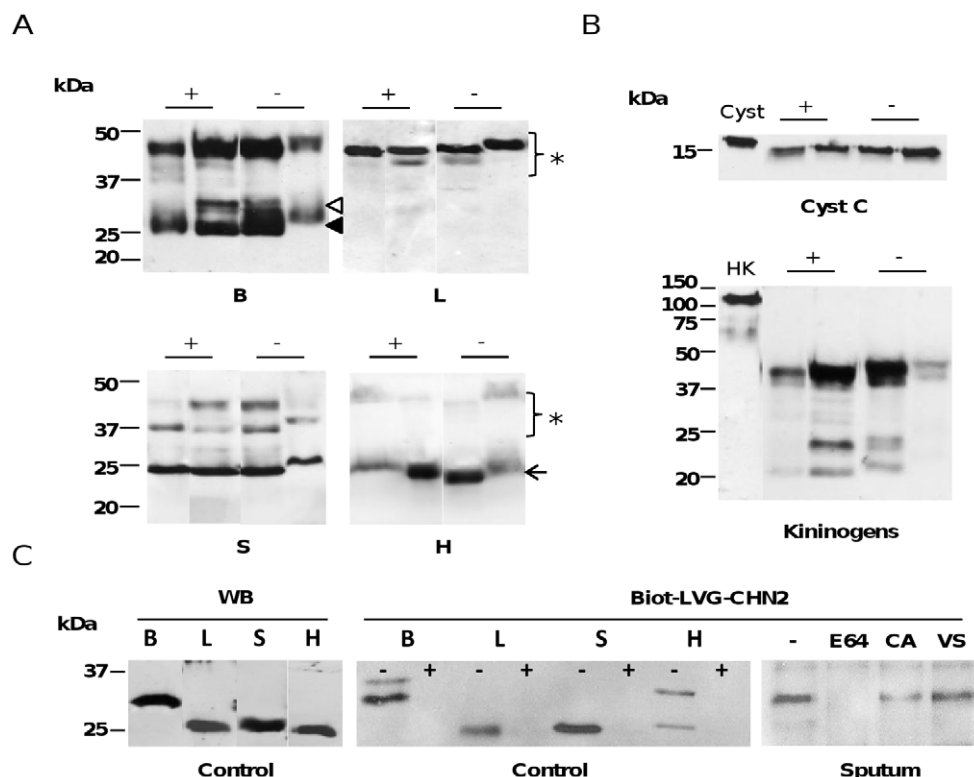


Figure 1. Cysteine cathepsins and their inhibitors in supernatants of CF sputum. Only representative samples are shown. (A) Proteins (30 μ g/well) were separated by 15% SDS-PAGE under reducing conditions, transferred to nitrocellulose membranes, and analyzed with polyclonal antibodies against human cathepsins B, H, L and S. (+): *Pseudomonas aeruginosa*-colonized CF sputum; (-): *Pseudomonas aeruginosa*-negative CF sputum. $\blacktriangle$, single-chain cathepsin B; $\blacktriangleleft$, double-chain cathepsin B; $\leftarrow$, mature cathepsins S and H; $\star$, proforms. (B) Immunostaining with polyclonal anti-cystatin C antibody and anti-kininogen antibody. (+): *Pseudomonas aeruginosa*-colonized CF sputum; (-): *Pseudomonas aeruginosa*-negative CF sputum. Control: Cyst, Cystatin C; HK, HMWK. Recombinant human cystatin C (R&D systems) has an additional C-terminal 10 His-tag and an apparent molecular mass of 17 kDa, according to the supplier. (C) Supernatants of CF sputum incubated with Biot-LVG-CHN₂ (30 μ M), for 1 h at 37°C [25]. Other samples were pre-incubated with E-64, CA-074, and Mu-Leu-Hph-VSPH prior to adding the biotinylated activity-based probe. Samples were separated by 12% SDS-PAGE, electroblotted and incubated with extravidin-peroxidase conjugate. The peroxidase activity was revealed by chemiluminescence. WB: individual cathepsins B, H, L and S immunoblotted as control. Control: (-), no pre-incubation with E-64; (+), pre-incubation with E-64 prior to adding Biot-LVG-CHN₂. Sputum: E-64, pre-incubation with E-64; CA, pre-incubation with CA-074; VS, pre-incubation with Mu-Leu-HphVSPH.

doi:10.1371/journal.pone.0025577.g001

Cystatin C and kininogens, the major plasma circulating inhibitors of cathepsins, have been also found in some inflammatory bronchoalveolar lavage fluids and epithelial lining fluids, but never before in CF samples (see for review: [6]). Our Western blot analysis detected cystatin C and high and/or low molecular weight kininogens in CF sputum (Figure 1B). Despite sputum HNE was reported to cleave cystatin C and release a N-terminally truncated form [29], we did not observe the presence of a shorter molecular form of cystatin C, as also suggested by agarose electrophoresis (data not shown). Conversely no intact but extensively degraded kininogens were detected. Similar degradation of kininogens have been found in other inflammatory body fluids, like synovial and amniotic fluids, and blood plasma (for review: [30]). The lack of undamaged kininogens together with the presence of kininogen fragments (circa 20–40 kDa) correlates with the recent demonstration that the inability of kininogens to inhibit cathepsin B (in contrast to cathepsins L and S) is associated with their extensive cleavage by cathepsin B [31]. We have also shown that Biot-LVG-CHN₂, a cystatin C-derived activity-based probe, binds to sputum cysteine cathepsins. Biot-LVG-CHN₂ efficiently labeled human cathepsins B, H, L and S (Figure 1C) by specifically targeting the nucleophilic active site thiol. One major band was found in CF sputum both with and without a *Pseudomonas* infection. This

labeling was abolished by E-64, broadly impaired by preincubation with CA-074, and to a lesser extent by Mu-Leu-Hph-VSPH. This provides strong evidence that cathepsin B (predominant reactive band corresponding to its double-chain form) is the most abundant CP, and that active cathepsin S is also present in CF sputum. Specific labeling with Biot-LVG-CHN₂ also confirmed that CPs, despite their susceptibility to thiol oxidation and the partially defective antioxidant defenses in the lung, may retain their enzymatic activity for some time in an oxidative environment [32,33,34].

As both high and low molecular weight kininogens were broken down in both Ps+ and Ps- CF sputum (Figure 1B), we added exogenous uncleaved HMWK to CF supernatants and analyzed the resulting mixture. E-64 and also CA-074 partially blocked the cleavage of exogenous HMWK (Figure 2), indicating that cathepsins play a part in the proteolysis of kininogens by CF sputum. Our data also confirmed that significant amounts of cathepsins may escape regulation by their endogenous inhibitors. This, together with the recent demonstration that the poor inactivation of cathepsin B (unlike the tight-binding inhibition of cathepsins L and S) by kininogens is associated with their extensive cleavage by cathepsin B [31], indicates that cathepsin B is a major protease involved in this process in CF sputum. This is

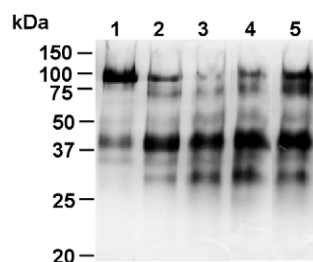


Figure 2. Degradation of human HMWK by CF sputum. Exogenous HMWK was incubated in the activity buffer with supernatants of CF sputum at 30°C for 0–5 hours. Hydrolysis products were separated by 12.5% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes and immunoblotted with rabbit polyclonal anti-kininogen antibody [24]. Lane 1, 0-h incubation; lane 2, 2-h incubation; lane 3, 5-h incubation; lane 4, 5-h incubation in the presence of CA-074; lane 5, 5-h incubation in the presence of E-64. For clarity, one representative sample is shown.
doi:10.1371/journal.pone.0025577.g002

also true for several other inflammatory disorders (for review: [30]).

Quantitative analysis of sputum cysteine cathepsins and their inhibitors

The characteristics of active proteases are expressed with reference to the total protein concentration in CF samples and not to volume (or dilution) of sputum supernatants in order to prevent any bias associated with clinical specimen during sputum collection. The BCA assays indicated that the median protein concentration in the 25 samples tested was 3.74 mg/ml (IQR1, 3.31 mg/ml; IQR3, 4.50 mg/ml; range, 1.21–14.25 mg/ml). All concentrations of active enzymes and inhibitors are given as medians, with IQR1 and IQR3 values in brackets. We first determined the specific activity of human neutrophil elastase using the FRET substrate Abz-Ala-Pro-Glu-Ile-Met-Arg-Arg-Gln-(3-NO₂-Tyr) whose amino acid sequence is highly selective for HNE [35]. The median values of active HNE in *P. aeruginosa*-positive samples were 480.4 (261.5/552.4) nmol/g protein and 80.4 (74.9/229.4) nmol/g in *P. aeruginosa*-negative samples. Thus, HNE activity in Ps+ CF sputum was significantly higher than in the Ps- CF sputum (p -value<0.01) (Figure 3C). The increased sputum HNE activity that is typically associated with a bacterial infection (mainly *S. aureus* and *P. aeruginosa*) and the ensuing influx of neutrophils agrees well with earlier reports indicating that elastase is a valuable marker of infection for CF patients (see for review: [36]). This is supported by the results of immunoblotting following SDS-PAGE under reducing conditions. A polyclonal anti-HNE antibody revealed a major band corresponding to free unbound elastase in Ps+ CF sputum (Figure 3C), while HNE in Ps- CF samples was mostly as higher molecular forms that correspond most probably to inhibitory complexes between HNE and α 1-protease inhibitor (α 1-PI), the major serine protease inhibitor in the lung [5]. Targeting of HNE by α 1-PI obey the suicide substrate inhibition mechanism of serpins with cleavage within the reactive center loop of α 1-PI and the formation of a 1:1 stoichiometric covalent inhibitory complex [37,38,39]. The individual (Figure 3A) and overall (Figure 3B) concentrations of active CF cathepsins were determined by titration (see “Material & Methods” for details). The overall active cathepsins in *P. aeruginosa*-positive samples was 211.5 (187.5/234.2) nmol/g, while the activity in *P. aeruginosa*-negative samples was 221.7 (214.8/239.6) nmol/g. This value is higher than that measured in silicosis

BALFs, but lower than the concentration of active CPs in BALFs from patients with acute lung infiltrative inflammatory disorders [6]. Cathepsin B is the most abundant cathepsin in CF sputum (Ps+ median: 111.5 (90.4/127.9) nmol/g; Ps- median: 112.1 (95.4/127.8) nmol/g), as suggested by immunochemical studies, followed by the aminopeptidase cathepsin H (Ps+ median: 62.4 (21.7/103.3) nmol/g; Ps- median: 29.5 (3.8/75.8) nmol/g) and the endopeptidase cathepsin L (Ps+ median: 40.5 (31.8/47.4) nmol/g; Ps- median: 35.6 (29.7/53.3) nmol/g). The median concentrations of cathepsin S were 19.1 (12.2/21.6) nmol/g in Ps+ sputum and 18.8 (13.3/21.6) nmol/g in Ps- CF sputum; the values for cathepsin K were similar: 17.7 (15.4/18.9) nmol/g in Ps+ sputum and 17.7 (17.2/20.6) nmol/g in Ps- CF sputum. The differences between *P. aeruginosa*-positive and *P. aeruginosa*-negative samples were not significant (p >0.05), including the apparent variation in cathepsin H. We also found no correlation between the elastase and cathepsin B activities, in contrast to the findings for sputum from patients with bronchiectasis [29].

We assessed the residual CP inhibitory capacity (CPI, expressed as inhibitory site equivalents) by measuring the ability of CF sputum to inhibit E-64-titrated papain, according to Assfalg-Machleidt et al. [28]. Again, we found no significant difference between *P. aeruginosa*-positive (116 (83.8/168.2) nmol/g) and negative (123.9 (104.7/186.6) nmol/g) samples (Figure 3B), showing no significant difference between the two groups. Conversely, the CP/CPI imbalance ($\sim$ 2-fold) was statistically significant (p <0.001) in both cases. Taken together that cleavage of cystatin C by HNE was known to lead to a critically weaker inhibition (three orders of magnitude) of cathepsin B [29], and that the CP/CPI imbalance is unchanged in both Ps+ and Ps- groups, results also support that cystatin C may be protected from the harmful activity of HNE in CF expectorations. On the other hand the CP/CPI imbalance is smaller than that in BALF from patients with acute infiltrative inflammatory disorders (CP/CPI balance: 3- to 5-fold), due to the concentration of active CPs being lower in CF sputum. These data indicated that cathepsin activities are out of control in chronic inflammation disorders, which supports the hypothesis that CPs take part in the degradation and remodeling of major ECM and BM components that are associated with the progression of the disease. But the exact contributions of individual cathepsins to the pathophysiology of CF remain unclear [16].

However our use of a standardized procedure in which proteolytic activities are expressed with reference to the protein content of each sample (nmole/g) confirms that HNE is a valuable marker of infection by *P. aeruginosa* (P <0.01), regardless of the method used. Our data also indicate that cathepsin activities may not be used as a reliable indicator of bacterial colonization and *Pseudomonas* infection, unlike a previous proposal [18]. Although it is well established that increased clearance promotes an influx of cells, which may increase the protein concentration in the sputum, these contradictory results underline that our qualitative analysis are not expressed with reference to sputum sample volume (or weight), which can vary during specimen collection.

Zymogen activation

High-Mr forms of extracellular cathepsin B, corresponding to a stable, noncovalent complex between cathepsin B and its 6-kDa propeptide, have been found in the media of mammary tumor explants and in purulent sputum from patients with bronchiectasis, an obstructive lung disease like emphysema and cystic fibrosis, with impaired clearance of mucous secretions [40]. Breakdown of the inhibitory propeptide resulted in increased enzymatic activity, indicating that extracellular stabilized cathepsin B can be dormant. We detected no such complexes in CF sputum, but we

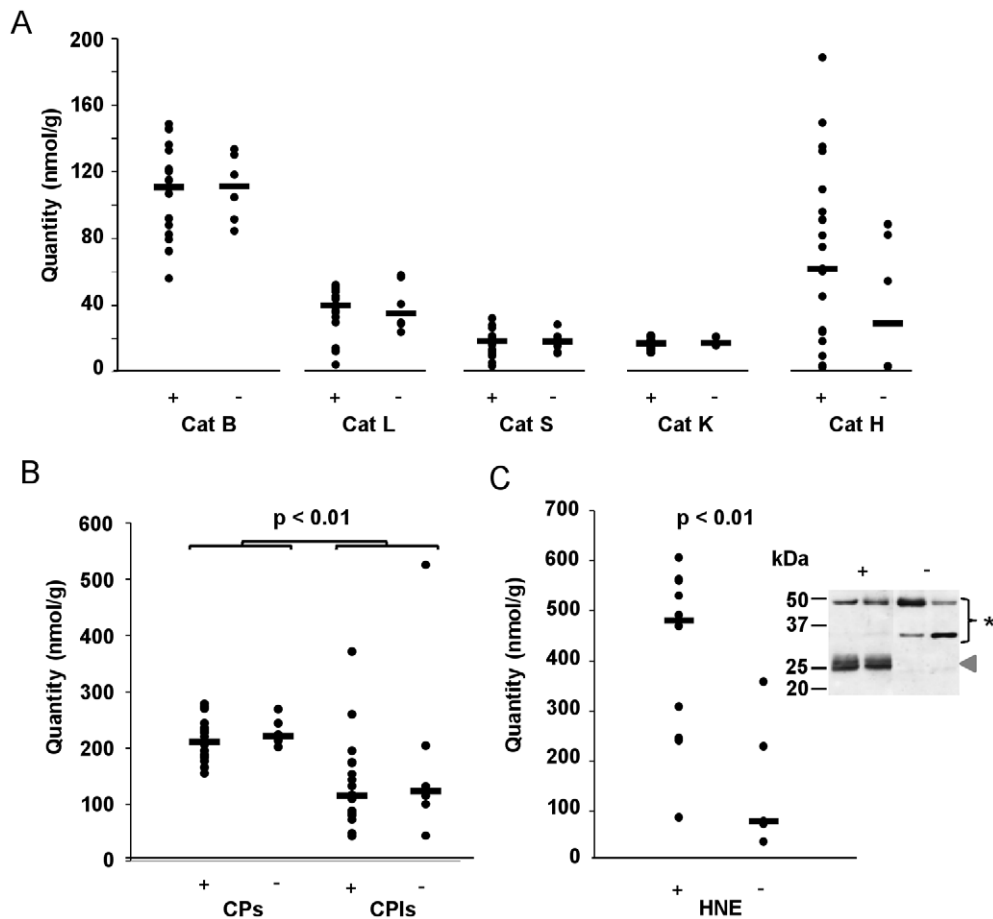


Figure 3. CP and HNE activities, and CP/CPI balance in CF sputum. (+): *P. aeruginosa*-colonized CF sputum; (–): *P. aeruginosa*-negative CF sputum. Cathepsins B, H, K, L and S and HNE activities were quantified as reported in details in the experimental section. Data are shown as individual points and statistically significant P values are shown. The horizontal bars indicate medians. (A) Cathepsins B, L, S, K and H. (B) CP/CPI balance. CPI: expressed as inhibitory site (cystatin-like) equivalent. (C) Elastase activities: the horizontal bars indicate medians. The western blot analysis was performed using a rabbit anti-HNE antibody (representative samples are shown). ◀, unbound HNE; ★, bound HNE.
doi:10.1371/journal.pone.0025577.g003

did find substantial extracellular amounts of immunoreactive procathepsins B, L and S (Figure 1). Thus the presence of acid oligosaccharides at cell surfaces [41] and the local acidic micro-environments in CF epithelial lining fluids [16] should lead to weaker interactions between the proregion and the catalytic domain, which may favor the autoproteolytic conversion to mature active cathepsins (for review: [42]). We investigated the *in vitro* activation of procathepsins B and S by incubating CF sputum under acidic conditions (Figure 4A). The two procathepsins had similar maturation patterns, and both were abolished by E-64 (data not shown). The band corresponding to the mature protease intensified and became maximal at 5 hours. The autocatalytic processing of cathepsin B led to the release of the ~24/25 kDa (double-chain), but not the ~31 kDa form, as mainly observed in CF sputum (Figure 1). This was associated with a relatively small (~1.6-fold) increase in proteolytic activity against AMC peptides, due to the concomitant time-dependent inactivation of cysteine cathepsins at 37°C. The quiescent procathepsins in CF sputum correspond to an activateable proteolytic reserve that may strengthen the CP/CPI imbalance and promote the deleterious elastolytic and collagenolytic activities of cathepsins, especially during exacerbation episodes. This is in contrast to the situation in samples from patients with silicosis [6]. Incubation of CF sputum at a weakly basic pH also led to the proteolytic release

of cathepsin B (~31 kDa; the single-chain form). Immunoblotting also showed that the rate and yield of activation were much greater in Ps+ sputum than in Ps– CF sputum (Figure 4B), while the processing of procathepsin B was impaired by Pefabloc, an irreversible serine protease inhibitor. Taken together that HNE activity in Ps+ CF sputum was significantly higher than in the Ps– CF sputum and a former report by Buttle et al. [43], the present observation supports that HNE may possibly process procathepsin B to its active form. However, our data also suggest that a such serine protease-dependent maturation of cathepsin B probably does not occur primarily in either *P. aeruginosa*-positive or *P. aeruginosa*-negative CF sputum, since the major band detected by immunoblotting and active-site labeling corresponded to the double-chain cathepsin B.

In conclusion, we identified active cathepsins B, H, K, L and S in sputum from CF patients, as well as proforms that may be processed autocatalytically or possibly by elastase (cathepsin B), in agreement with the overproduction and secretion of cysteine cathepsins in chronic lung inflammatory diseases [44]. We also found that kininogens, their natural circulating inhibitors, are extensively degraded. Thus the overall imbalance between cysteine proteases and related inhibitors favors the uncontrolled proteolytic activities of cathepsins. These uncontrolled cathepsins could then contribute to the pathophysiological breakdown/

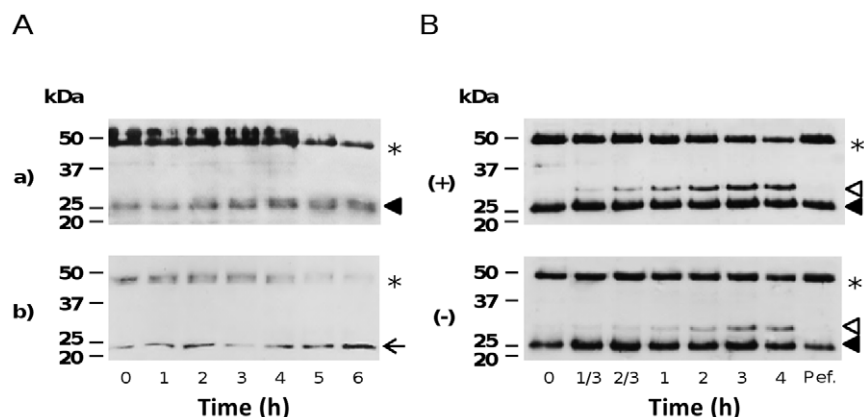


Figure 4. Maturation of human procatepsins in CF sputum. (A) Autocatalytic maturation of procatepsins B and S. Supernatants were incubated for up to 6 h in 100 mM sodium acetate buffer pH 4.3, 10 μ g/ml dextran sulfate, 4 mM DTT, at 37°C. The maturation products were separated by 12% SDS/PAGE under reducing conditions, transferred to a nitrocellulose membrane and analyzed by western blotting using polyclonal antibodies specific for (a) human cathepsin B and (b) human cathepsin S. One representative sample is shown. ★, proforms; ◀▶, mature double-chain cathepsin B; ◀, mature cathepsin S. (B) Elastase-dependent maturation of procatepsin B. Supernatants were incubated for up to 4 h in 50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.05% NP40 at 37°C and the maturation products analyzed by immunoblotting using a polyclonal anti-cathepsin B antibody. Pefabloc was used as control (4 h). Pef, Pefabloc (AEBSF). (+): *P. aeruginosa*-positive CF sputum (one representative sample); (–): *P. aeruginosa*-negative CF sputum (one representative sample). ◀, single-chain cathepsin B; ◀▶, double-chain cathepsin B; ★, procatepsin B. doi:10.1371/journal.pone.0025577.g004

remodeling of the extra cellular matrix components that occurs in cystic fibrosis. Cathepsins also seem play a critical role in the regulation of the antimicrobial activity of innate immunity proteins in cystic fibrosis, thus favoring the colonization by pathogens like *P. aeruginosa*, and infection. Cysteine cathepsins cleave beta-defensins, lactoferrin, and secretory leukocyte protease inhibitor and abrogate their microbicidal activity [44]. However we observed no significant difference in the CP activities and CP/CPI imbalance of *P. aeruginosa*-positive samples and *P. aeruginosa*-negative samples. Hence the cathepsin activities cannot be used as an indicator of colonization by this pathogen in CF patients. Unlike neutrophil elastase, human cathepsins are not consistent markers of infection by *P. aeruginosa* in CF patients.

References

- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245: 1073–1080.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245: 1066–1073.
- Grasemann H, Ratjen F (2010) Emerging therapies for cystic fibrosis lung disease. *Expert Opin Emerg Drugs* 15: 653–659.
- Pham CT (2006) Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol* 6: 541–550.
- Korkmaz B, Moreau T, Gauthier F (2008) Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie* 90: 227–242.
- Lalmanach G, Diot E, Godat E, Lecaillon F, Herve-Grepinet V (2006) Cysteine cathepsins and caspases in silicosis. *Biol Chem* 387: 863–870.
- Lecaillon F, Kaleta J, Bromme D (2002) Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev* 102: 4459–4488.
- Turk V, Turk B, Turk D (2001) Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J* 20: 4629–4633.
- Buhling F, Waldburg N, Reisenauer A, Heimburg A, Golpon H, et al. (2004) Lysosomal cysteine proteases in the lung: role in protein processing and immunoregulation. *Eur Respir J* 23: 620–628.
- Veillard F, Lecaillon F, Lalmanach G (2008) Lung cysteine cathepsins: intruders or unorthodox contributors to the kallikrein-kinin system? *Int J Biochem Cell Biol* 40: 1079–1094.
- Takeyabu K, Betsuyaku T, Nishimura M, Yoshioka A, Tanino M, et al. (1998) Cysteine proteinases and cystatin C in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Eur Respir J* 12: 1033–1039.
- Perdereau C, Godat E, Maurel MC, Hazouard E, Diot E, et al. (2006) Cysteine cathepsins in human silicotic bronchoalveolar lavage fluids. *Biochim Biophys Acta* 1762: 351–356.
- Serveau-Avesque C, Martino MF, Herve-Grepinet V, Hazouard E, Gauthier F, et al. (2006) Active cathepsins B, H, K, L and S in human inflammatory bronchoalveolar lavage fluids. *Biol Cell* 98: 15–22.
- Kasabova M, Saidi A, Naudin C, Sage J, Lecaillon F, et al. (2011) Cysteine Cathepsins: Markers and Therapy Targets in Lung Disorders. *Clinic Rev Bone Miner Metab* 9: 148–161.
- May TB, Shinabarger D, Maharaj R, Kato J, Chu L, et al. (1991) Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Rev* 4: 191–206.
- Quinn DJ, Weldon S, Taggart CC (2010) Antiproteases as therapeutics to target inflammation in cystic fibrosis. *Open Respir Med J* 4: 20–31.
- Taggart CC, Greene CM, Smith SG, Levine RL, McCray PB, Jr., et al. (2003) Inactivation of human beta-defensins 2 and 3 by elastolytic cathepsins. *J Immunol* 171: 931–937.
- Rogan MP, Taggart CC, Greene CM, Murphy PG, O'Neill SJ, et al. (2004) Loss of microbicidal activity and increased formation of biofilm due to decreased lactoferrin activity in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 190: 1245–1253.
- Taggart CC, Lowe GJ, Greene CM, Mulgrew AT, O'Neill SJ, et al. (2001) Cathepsin B, L, and S cleave and inactivate secretory leukoprotease inhibitor. *J Biol Chem* 276: 33345–33352.
- Martin SL, Moffitt KL, McDowell A, Greenan C, Bright-Thomas RJ, et al. (2010) Association of airway cathepsin B and S with inflammation in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 45: 860–868.
- Grasemann H (2010) Do the cysteine proteinases cathepsin B and S contribute to cystic fibrosis lung disease? *Pediatr Pulmonol* 45: 845–846.
- Lalmanach G, Mayer R, Serveau C, Scharfstein J, Gauthier F (1996) Biotin-labelled peptidyl diazomethane inhibitors derived from the substrate-like sequence of cystatin: targeting of the active site of cruzipain, the major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 318(Pt 2): 395–399.

Acknowledgments

We thank Dr. Owen Parkes (Romagné, France) for editing the English text. Mu-Leu-Hph-VSPH (cathepsin S inhibitor) was kindly provided by Dr. J.H. McKerrow (University of California, San Francisco, CA, USA).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CN FL GL. Performed the experiments: CN AJ-G AS EG. Analyzed the data: CN FL GL. Contributed reagents/materials/analysis tools: GC PP FG FK. Wrote the paper: GL.

23. Gilligan PH, Kiska DL, Appleman MD (2006) Cystic fibrosis microbiology; Appleman MD, ed. Coordinating ed., Appleman M.D. Washington, D.C.: ASM Press.
24. Lalmanach G, Hoebeke J, Moreau T, Ferrer-Di Martino M, Gauthier F (1992) An immunochemical approach to investigating the mechanism of inhibition of cysteine proteinases by members of the cystatin superfamily. *J Immunol Methods* 149: 197–205.
25. Florent I, Lecaillon F, Montagne JJ, Gauthier F, Schrevel J, et al. (2005) Labelling of four distinct trophozoite falcipains of *Plasmodium falciparum* by a cystatin-derived probe. *Biol Chem* 386: 401–406.
26. Barrett AJ, Kembhavi AA, Brown MA, Kirschke H, Knight CG, et al. (1982) L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem J* 201: 189–198.
27. Bromme D, Bonneau PR, Lachance P, Wiederanders B, Kirschke H, et al. (1993) Functional expression of human cathepsin S in *Saccharomyces cerevisiae*. Purification and characterization of the recombinant enzyme. *J Biol Chem* 268: 4832–4838.
28. Assfalg-Machleidt I, Billing A, Frohlich D, Nast-Kolb D, Joka T, et al. (1992) The role of the kininogens as cysteine proteinase inhibitors in local and systemic inflammation. *Agents Actions Suppl* 38: 312–321.
29. Buttle DJ, Burnett D, Abrahamson M (1990) Levels of neutrophil elastase and cathepsin B activities, and cystatins in human sputum: relationship to inflammation. *Scand J Clin Lab Invest* 50: 509–516.
30. Lalmanach G, Naudin C, Lecaillon F, Fritz H (2010) Kininogens: More than cysteine protease inhibitors and kinin precursors. *Biochimie* 92: 1568–1579.
31. Naudin C, Lecaillon F, Chowdhury S, Krupa JC, Purisima E, et al. (2010) The occluding loop of cathepsin B prevents its effective inhibition by human kininogens. *J Mol Biol* 400: 1022–1035.
32. Godat E, Herve-Grepinet V, Veillard F, Lecaillon F, Belghazi M, et al. (2008) Regulation of cathepsin K activity by hydrogen peroxide. *Biol Chem* 389: 1123–1126.
33. Herve-Grepinet V, Veillard F, Godat E, Heuze-Vourc'h N, Lecaillon F, et al. (2008) Extracellular catalase activity protects cysteine cathepsins from inactivation by hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 582: 1307–1312.
34. Owen CA (2005) Proteinases and oxidants as targets in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2: 373–385.
35. Korkmaz B, Attucci S, Moreau T, Godat E, Juliano L, et al. (2004) Design and use of highly specific substrates of neutrophil elastase and proteinase 3. *Am J Respir Cell Mol Biol* 30: 801–807.
36. Korkmaz B, Horwitz MS, Jenne DE, Gauthier F (2010) Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol Rev* 62: 726–759.
37. Gettins PG (2002) Serpin structure, mechanism, and function. *Chem Rev* 102: 4751–4804.
38. Potempa J, Korzus E, Travis J (1994) The serpin superfamily of proteinase inhibitors: structure, function, and regulation. *J Biol Chem* 269: 15957–15960.
39. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW, Church FC, Coughlin PB, et al. (2001) 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: 33293–33296.
40. Mach L, Mort JS, Glossl J (1994) Noncovalent complexes between the lysosomal proteinase cathepsin B and its propeptide account for stable, extracellular, high molecular mass forms of the enzyme. *J Biol Chem* 269: 13036–13040.
41. Majerle A, Jerala R (2003) Protein inhibitors form complexes with procathepsin L and augment cleavage of the propeptide. *Arch Biochem Biophys* 417: 53–58.
42. Wiederanders B (2003) Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. *Acta Biochim Pol* 50: 691–713.
43. Buttle DJ, Abrahamson M, Burnett D, Mort JS, Barrett AJ, et al. (1991) Human sputum cathepsin B degrades proteoglycan, is inhibited by alpha 2-macroglobulin and is modulated by neutrophil elastase cleavage of cathepsin B precursor and cystatin C. *Biochem J* 276: 325–331.
44. Taggart CC, Greene CM, Carroll TP, O'Neill SJ, McElvaney NG (2005) Elastolytic proteases: inflammation resolution and dysregulation in chronic infective lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 171: 1070–1076.

2. Mécanisme d'inhibition de la cathepsine B par les kininogènes

Article 2: The occluding loop of cathepsin B prevents its effective inhibition by human kininogens

C. Naudin, F. Lecaille, S. Chowdhury, J. C. Krupa, E. Purisima, J. S. Mort & G. Lalmanach (2010)

Journal of Molecular Biology, 400 : 1022-35

L'activité des cathepsines à cystéine est spécifiquement régulée par les inhibiteurs de la superfamille des cystatines (pour revue : Lalmanach *et al.*, 2010). On distingue dans cette superfamille les stéfines, les cystatines et les kininogènes. Le mécanisme général d'inhibition de la superfamille fait intervenir trois régions qui s'insèrent dans le site actif : une région N-terminale avec une glycine conservée, une boucle contenant une séquence consensus QxVxG et une deuxième boucle. Les kininogènes, le HMWK et le LMWK (pour *High* et *Low molecular weight kininogen*), représentent les inhibiteurs plasmatiques majoritaires des cathepsines. Ils sont constitués d'une chaîne légère identique de trois domaines de type cystatine dont deux domaines, les domaines D2 et D3, sont des inhibiteurs des cathepsines. Contrairement aux stéfines et aux cystatines, nous disposons à l'heure actuelle de données encore limitées au niveau structural et mécanistique pour les kininogènes.

En conditions physiologiques, les kininogènes, avec la cystatine C, maintiennent l'activité des cathepsines sous contrôle. Cependant, lors de pathologies inflammatoires aiguës et chroniques, il y a un déséquilibre de la balance cathepsines / inhibiteurs en faveur des protéases, où la cathepsine B est la plus abondante, représentant jusqu'à 50 % de l'activité totale des cathepsines dans les LLBA des patients (Perdereau *et al.*, 2006; Serveau-Avesque *et al.*, 2006). De plus, les kininogènes sont retrouvés dégradés dans ces mêmes lavages et cette dégradation est dépendante en partie de l'activité des cathepsines. En outre, une étude précédente révèle que la cathepsine B, qui est faiblement inhibée par les kininogènes, est capable de les dégrader (Barros *et al.*, 2004). La cathepsine B, outre son activité endopeptidasique, possède également une activité exopeptidasique, et cette double activité est due à la présence d'une boucle d'occlusion de 20 résidus. Cette boucle d'occlusion, qui limite

l'accès au site actif, est maintenue par un pont salin, et est composée de deux résidus critiques pour son positionnement : His110 et His111 (Illy *et al.*, 1997; Krupa *et al.*, 2002).

Dans la présente étude, nous avons montré que la cathepsine B clive les kininogènes dans les régions interdomaines dites « hypersensibles » à la protéolyse, mais également dans le domaine D3 à proximité de la séquence consensus QVVAG. Cependant, la mutation du résidu His110 dans la boucle d'occlusion entraîne la perte de ces clivages et permet la formation d'un complexe stable entre l'enzyme et les kininogènes. L'inhibition obtenue avec ce mutant, His110Ala, est alors similaire à celle obtenue avec la cathepsine L. Ces résultats, montrant l'implication de la boucle d'occlusion dans le défaut d'inhibition, sont soutenus par la modélisation moléculaire des domaines isolés complexés avec les formes sauvage ou mutantes de la cathepsine B. En effet, nous montrons la formation d'un complexe stable dans le cas du mutant His110Ala qui possède une boucle d'occlusion ouverte, suite à la perte du pont salin, ne limitant plus l'accès au site actif.

A ce jour, des études antérieures avaient montré que la boucle d'occlusion confère à la cathepsine B une activité carboxypeptidasique spécifique alors que les autres cathepsines, telle que les cathepsines L et S, possèdent seulement une activité endopeptidasique. Avec cette étude, nous montrons qu'outre son rôle dans la spécificité enzymatique, la boucle d'occlusion est également impliquée dans le défaut de régulation de la cathepsine B par ses inhibiteurs plasmatiques principaux que sont les kininogènes. Ainsi le défaut d'inhibition associé à l'hydrolyse de ces inhibiteurs révèle l'importance de cette cathepsine dans le déséquilibre de la balance protéases / inhibiteurs. Etant donné l'implication de la cathepsine B dans les processus physiopathologiques, son abondance et son manque de régulation, cette cathepsine présente par conséquent un intérêt particulier dans la compréhension des mécanismes inflammatoires (pour revue : Kasabova *et al.*, 2011). Par ailleurs, elle est susceptible d'être une cible de choix dans le traitement de ces pathologies inflammatoires.

JMBAvailable online at www.sciencedirect.com ScienceDirect

The Occluding Loop of Cathepsin B Prevents Its Effective Inhibition by Human Kininogens

C. Naudin^{1†}, F. Lecaille^{1†}, S. Chowdhury², J. C. Krupa³, E. Purisima⁴, J. S. Mort³ and G. Lalmanach^{1*}¹*Inserm U618, Protéases et Vectorisation Pulmonaires, Université François Rabelais, Tours, France*²*Lady Davis Institute of Medical Research, McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada*³*Shriners Hospital for Children and Department of Surgery, McGill University, Montreal, Quebec, Canada*⁴*National Research Council Canada, Biotechnology Research Institute, Computational Chemistry, Montreal, Quebec, Canada*Received 15 March 2010;
received in revised form

26 May 2010;

accepted 1 June 2010

Available online

9 June 2010

Edited by R. Huber

Kininogens, the major plasma cystatin-like inhibitors of cysteine cathepsins, are degraded at sites of inflammation, and cathepsin B has been identified as a prominent mediator of this process. Cathepsin B, in contrast to cathepsins L and S, is poorly inhibited by kininogens. This led us to delineate the molecular interactions between this protease and kininogens (high molecular weight kininogen and low molecular weight kininogen) and to elucidate the dual role of the occluding loop in this weak inhibition. Cathepsin B cleaves high molecular weight kininogen within the N-terminal region of the D2 and D3 cystatin-like domains and close to the consensus QVVAG inhibitory pentapeptide of the D3 domain. The His110Ala mutant, unlike His111Ala cathepsin B, fails to hydrolyze kininogens, but rather forms a tight-binding complex as observed by gel-filtration analysis. K_i values (picomolar range) as well as association rate constants for the His110Ala cathepsin B variant compare to those reported for cathepsin L for both kininogens. Homology modeling of isolated inhibitory (D2 and D3) domains and molecular dynamics simulations of the D2 domain complexed with wild-type cathepsin B and its mutants indicate that additional weak interactions, due to the lack of the salt bridge (Asp22-His110) and the subsequent open position of the occluding loop, increase the inhibitory potential of kininogens on His110Ala cathepsin B.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: cysteine protease; cystatin; kininogen; protease inhibitor; proteolysis

*Corresponding author. INSERM U618 Protéases et Vectorisation Pulmonaires, Equipe Protéases et Pathologies Pulmonaires, Université François Rabelais—Faculté de Médecine, 10 Boulevard Tonnellé, F—37032 Tours cedex, France. E-mail address: gilles.lalmanach@univ-tours.fr.

† C.N. and F.L. contributed equally to this work.

Abbreviations used: AMC, 7-amino-4 methylcoumarin; CA-074, (L-3-*trans*-(propylcarbamoyl)oxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline; CP, cysteine protease; CPI, cysteine protease inhibitor; E-64, L-3-carboxy-*trans*-2,3-epoxypropionyl-leucylamido-(4-guanidino) butane; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; HMWK, high molecular weight kininogen; LMWK, low molecular weight kininogen; MD, molecular dynamics; PBS, phosphate-buffered saline; PDB, Protein Data Bank; SCR, structurally conserved region; Z, benzyloxycarbonyl.

Introduction

Under physiological conditions, the proteolytic activities of cysteine cathepsins [cysteine proteases (CPs)] are specifically regulated by inhibitors of the cystatin superfamily [cysteine protease inhibitors (CPIs), MEROPS family I25¹], which includes stefins, cystatins, and kininogens.^{2,3} Globally, the inhibitory sites of these proteins consist of three regions that form a wedge-shaped binding surface, an N-terminal region with a conserved glycyl residue, a hairpin loop containing the consensus sequence Gln-X-Val-X-Gly, and a second C-terminal hairpin loop.^{4,5} Stefins (family 1) are single-domain proteins of about 100 amino acids devoid of disulfide bonds (~11 kDa), while family 2 cystatins (~12 kDa) have two internal disulfide bonds and may be glycosylated or phosphorylated.^{6,7} Two

multi-functional, multi-domain glycoproteins, termed high molecular weight kininogen (HMWK, 90–120 kDa) and low molecular weight kininogen (LMWK, 50–70 kDa),^{8,9} make up family 3. Besides being precursors of proinflammatory peptides (kinins), novel functions of kininogens or their cleaved forms (such as angiostatic or microbicidal properties) have been recently reviewed by Lalmach *et al.*¹⁰ Both kininogens consist of an identical N-terminal heavy chain, three tandemly repeated cystatin-like domains (D1, D2, and D3), a short domain (D4) corresponding to the kinin moiety, and distinct light chains (HMWK: domains D5 and D6; LMWK: domain D5) at their C-terminus. The first domain (D1) does not possess inhibitory properties, while domains D2 and D3 are tight-binding inhibitors of cysteine cathepsins.^{11,12}

Genes for 11 functional papain-like cysteine cathepsins (clan CA, family C1) are present in the human genome.^{13,14} In addition to protein degradation and turnover in the endosomal/lysosomal system, these proteases mediate extracellular matrix turnover, antigen presentation, and processing events^{15–17} and represent promising drug targets for osteoporosis, Alzheimer disease, asthma, arthritis, and cancer.^{18–20} Their catalytic site is highly conserved and is formed by three residues: Cys25 (nucleophile), His159, and Asn175 (papain numbering). Activity depends on the protonated His159/deprotonated Cys25 ion pair, which is stabilized by the side chain of Asn175.²¹ Modifications to two members of this family allow them to act as carboxypeptidases. A short loop is present in cathepsin X, which constrains its S' site, restricting its activity to the removal of single residues from the substrate C-terminus.²² In contrast, cathepsin B acts as a broad-spectrum endopeptidase, with an optimal activity in mildly acidic pH,²³ but it is also a peptidyl dipeptidase, sequentially removing C-terminal dipeptides.²⁴ X-ray structural analysis disclosed the molecular basis for this dual character, showing the presence of a 20-residue insertion (termed the "occluding loop"^{25–29}) that is held in place by salt bridges and blocks off the C-terminal side of the substrate-binding cleft.³⁰ Deletion of the cathepsin B occluding loop leads to a complete elimination of exopeptidase activity,³¹ and two critical residues (His110 and His111) have been identified to exert a key role in the positioning of the occluding loop.³²

Enzymes lacking a loop insertion such as cathepsins L, S, H, and K are efficiently inactivated by "three finger tip" inhibitors, that is, cystatins or chagasin (MEROPS family I42).^{9,33} Cathepsin X with its non-flexible "mini-loop"²² is therefore resistant to cystatin C inhibition.³⁴ Since the occluding loop in cathepsin B is flexible, it is inhibited by cystatins (low micromolar).³⁵ While general features of the binding and inhibition of cathepsin B by stefins (family 1) and cystatins (family 2) have been well established,³⁶ fewer studies have been reported for kininogens (family 3 cystatins). LMWK cystatin-like domains (D2 and D3 domains) bind each cathepsin

molecule independently and D3 has a larger k_{on} , resulting in greater inhibitor potential.³⁷ Similarly, HMWK obeys a 2:1 binding stoichiometry, with different rate constants for each binding site.³⁸ Numerous three-dimensional structures of cystatins and stefins have been described,^{39–42} whereas no structural or mechanistic data are presently available for kininogens.

The presence of two of the major CPIs in plasma, cystatin C and kininogens, keeps under control CP activities under normal conditions (see, for review, Refs. 2 and 3). However, an imbalance may occur under pathophysiological conditions. For instance, cathepsin B levels are increased in sera from patients with breast, ovarian, bladder, and uterine cervical cancer and melanoma (see, for review, Ref. 43). Besides cancer, cathepsin B has been implicated in inflammatory diseases, and an upregulated level of cathepsin B was found in patients with rheumatoid arthritis⁴⁴ while circulating cathepsin B–kininogen complexes were detected in plasma from patients with inflammatory disorders, but not from healthy individuals.⁴⁵ Recently, we identified active cathepsin B as the most abundant CP in bronchoalveolar lavage fluids from patients with acute inflammatory diseases or silicosis,^{46–48} and interestingly, the kininogens were found to be extensively degraded (for review, see Ref. 49). Inhibitory kininogen fragments (*circa* 20–40 kDa) that may be produced under pathophysiological conditions, for example, in disseminated intravascular coagulation or polytrauma,⁵⁰ were found in body fluids including ascites, synovial fluid, and plasma and in placenta.^{12,44,51,52} Among proteases mediating such cleavages, cathepsin D, an aspartic protease, may process kininogens,⁵² and we demonstrated that kininogen degradation partly depends on CP activities in bronchoalveolar lavage fluids.⁴⁸

The importance of cathepsin B as drug target in human illness, including tumor metastasis, inflammation, or Alzheimer disease,¹⁹ requires an improved understanding of cathepsin B regulation, which can be exploited in the design of more selective and potent inhibitors.⁵³ The absence of robust interactions between cathepsin B and kininogens that favor the CP/CPI imbalance and the deleterious activity of cathepsin B is of significant interest. The rationale for the present work was to account for the ineffective inhibition of cathepsin B by kininogens. Molecular events arising during cathepsin B/kininogen interactions have been studied, and reasons for the weak inhibition were elucidated. Cathepsin B cleaved within the N-terminal region of both D2 and D3 cystatin-like domains and close to the QVVAG consensus region of the D3 domain, leading to subtle structural rearrangements of HMWK as suggested by circular dichroism (CD) analysis. In addition to the well-documented impairment of peptidyl dipeptidase activity, the lack of a functionally "closed" occluding loop allows the formation of a stable, tight-binding, and uncleaved complex between His110Ala cathepsin B mutant and kininogens, displaying K_i values similar to those for cathepsin L inhibition. Modeling

analysis and molecular dynamics (MD) calculations consistently support these experimental findings.

Results and Discussion

Processing of HMWK by cathepsin B

In contrast to cathepsins L and K, cathepsin B is poorly inhibited (K_i in the micromolar range³³) by kininogens that show a 2:1 binding stoichiometry with their target enzymes. Cathepsin B retained approximately 70% activity towards the synthetic substrate benzyloxycarbonyl (Z)-Phe-Arg-7-amino-4 methylcoumarin (AMC) under equimolar conditions (1:1), as well as in the presence of a stoichiometric excesses of HMWK (inhibitory sites/cathepsin B molar ratios of 4:1 and 2:1), confirming the inability of HMWK to effectively control cathepsin B activity. However, this residual and incomplete inhibition was stable for 60 min and remained unaffected by overnight incubation (data not shown), while cathepsin B was fully inhibited by addition of tight-binding cystatin C in a parallel experiment. Nevertheless, SDS-PAGE analysis (Coomassie Blue staining) indicated that cathepsin B generated two major cleavage products of ~80 and 60 kDa in a dose-dependent manner and a third fragment of ~35 kDa from HMWK (Fig. 1a) following 1 h incubation. This cleavage is abrogated in the presence of L-3-carboxy-*trans*-2,3-epoxypropionyl-leucylamido-(4-guanidino) butane (E-64), supporting the earlier proposal that HMWK is a substrate for cathepsin B under pathophysiological conditions.⁵⁴ In addition to its predominant native form, two lower bands may be observed for HMWK (Fig. 1b, lane 1) in the presence of a polyclonal anti-human HMWK, corresponding to faint amounts of degradation products that are not observed by Coomassie Blue staining (Fig. 1a, lane 1). Western blot analysis also revealed two additional minor hydrolysis products (M_r ~30 kDa and M_r ~20 kDa, respectively) that are hard to distinguish because of their low intensity and a band of M_r ~12 kDa in the presence of the anti-HMWK antibody. Cleavage positions within HMWK were identified by N-terminal sequencing (Fig. 1c). Two of these cleavage sites correspond to primary attack sites in the so-called "proteinase-sensitive regions" described by Vogel *et al.*¹² These regions that are located at the junctions of the three cystatin-like domains constituting the kininogen heavy chain were initially identified as two stretches of 11–12 residues susceptible to hydrolysis by bromelain, trypsin, chymotrypsin, and elastase. Indeed, cathepsin B cleaved the D2 cystatin-like domain of HMWK at the Cys124-Leu125 bond, two residues upstream of the N-terminal, highly conserved Gly126, and the D3 domain at the Lys244-Ile245 bond, four residues upstream of its conserved glycyl residue (Gly248), the latter cleavage occurring at the same position as that of trypsin.¹² The Ile283-Asp284 bond near the

consensus QVVAG inhibitory pentapeptide of the D3 domain is also vulnerable upon incubation with cathepsin B. These cleavages occurring in the vicinity of critical residues of the inhibitory machinery most probably participate in the weak inhibition of cathepsin B, corroborating that HMWK could be considered as a cathepsin B substrate under pathological conditions.⁵⁴ It could be also hypothesized that the conformational constraint imposed by the presence of the cathepsin B occluding loop may enhance the proteolytic susceptibility of HMWK. Interestingly, it was shown that, following the degradation of the HMWK heavy chain into smaller cystatin-like domains by the action of serine proteases, the released domains remain potent inhibitors of cathepsin L.¹² Furthermore, truncation of the N-terminal region of the third cystatin-like domain of rat T-kininogen (thiostatin) does not prevent it from inhibiting cathepsin L, which is in contrast to findings with family 2 cystatin.⁵⁵

Similarly, we assessed the ability of proteolysis products of HMWK, generated by the action of wild-type cathepsin B, to inhibit cathepsin L. Despite the fact that cathepsin B cleaves both D2 and D3 domains in the vicinity of highly conserved residues thought to participate in the reactive inhibitory site, after incubation of HMWK with cathepsin B for 1 h, followed by the addition of the selective inhibitor of cathepsin B (L-3-*trans*-(propyl-carbamoyl)oxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline (CA-074), the inhibitory potential of HMWK towards cathepsin L remained unaffected and was comparable to uncleaved kininogen (data not shown). The *in vivo* formation of kininogen inhibitory fragments was proposed to be a relevant way of inhibiting cysteine cathepsins during inflammatory episodes that favor the local release of lysosomal proteinases from cells and tissues.^{56,57} In addition, four extra cleavage sites were identified for cathepsin B; one inside the non-inhibitory domain D1 (junction Gly49-Ser50), one between Gly366 and Phe367 within domain 4, corresponding to the insertion site of bradykinin, and two in the middle part of domain 5 (His421-Asn422 and Gly452-Leu453 bonds). Identification of a single cleavage at the Gly366-Phe367 bond within the bradykinin moiety confirms that cathepsin B is unable to generate pharmacologically active kinins from kininogens.⁵⁸

Further investigation by CD spectroscopy was performed as shown in Fig. 2. The far-UV CD spectrum of unbound HMWK corresponded to ~28% β -structure (SOMCD software⁵⁹), agreeing with its estimated secondary structures calculated by Jpred 3.⁶⁰ For the sake of clarity, the far-UV CD spectra of HMWK corresponding to HMWK/cathepsin B mixtures were reported after subtraction of the individual CD spectrum of wild-type cathepsin B. A decrease of β -structure (~16%) was observed in the presence of 2 mM dithiothreitol (DTT) in comparison to free HMWK. In contrast, the CD spectrum of the HMWK/cathepsin B mixture in the absence of DTT in the assay buffer did not differ

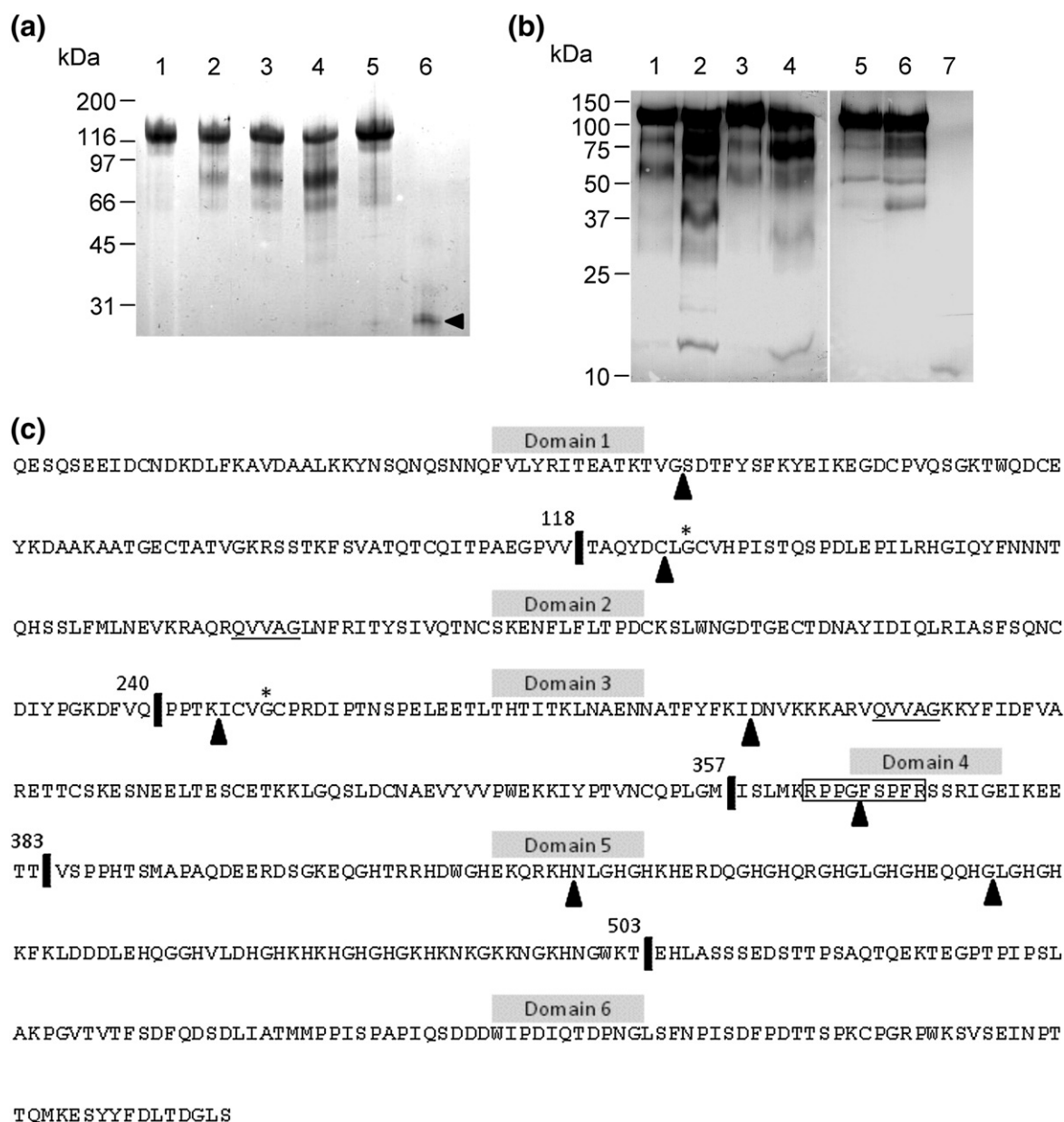


Fig. 1. Hydrolysis of HMWK by cathepsin B. (a) Dose-dependent degradation of HMWK by cathepsin B. HMWK (480 nM) was incubated with increasing concentrations of cathepsin B (inhibitory sites/cathepsin B molar ratios of 4:1, 2:1, and 1:1 respectively) in the assay buffer at 37 °C for 1 h prior to separation of the cleavage products on a (10–15%) gradient polyacrylamide gel under non-reducing conditions. Lane 1, HMWK; lane 2, HMWK/cathepsin B (4:1); lane 3, HMWK/cathepsin B (2:1); lane 4, HMWK/cathepsin B (1:1); lane 5, HMWK/cathepsin B (1:1) preincubated by E-64 (10 μM); lane 6, cathepsin B (indicated by an arrow). (b) Immunodetection of cleavage products of HMWK by cathepsin B. HMWK (two cystatin-like inhibitory sites/molecule) was incubated with cathepsin B (molar ratio of 4:1) at 37 °C for 1 h. Following their separation by 12% SDS-PAGE under reducing (lanes 1, 2, 5, 6, and 7) and non-reducing (lanes 3 and 4) conditions and transfer onto a nitrocellulose sheet, hydrolysis products were immunodetected by using a rabbit polyclonal anti-HMWK antibody⁵¹ (lanes 1 to 4) and a goat polyclonal anti-kininostatin (domain D5 of the light chain) antibody (lanes 5 to 7). Lanes 1, 3, and 5, HMWK; lanes 2, 4, and 6, HMWK/cathepsin B; lane 7, kininostatin. (c) Location of cathepsin B cleavage sites within HMWK. Schematic representation of the primary sequence of HMWK (Uniprot-Swissprot ID: P01042) that shows (delineated with vertical bars), starting from the amino-terminus, the three cystatin-like domains of the heavy chain (domains 1–3), the bradykinin (BK) moiety (D4), and both domains D5 (kininostatin) and D6 that compose the carboxy-terminal light chain. The QVVAG consensus sequence of inhibitory domains 2 and 3 is underlined. The two N-terminal invariant glycine residues of domains D2 and D3 are highlighted (*). Seven cleavage sites (▲) were identified by N-terminal peptide sequencing.

significantly from that of free HMWK (Fig. 2). Observed structural changes of HMWK are DTT-dependent and a result of its hydrolysis by cathepsin

B rather than to a rearrangement due to weak HMWK–cathepsin B binding interactions. Despite the fact that cathepsin B cleaves HMWK in a time-

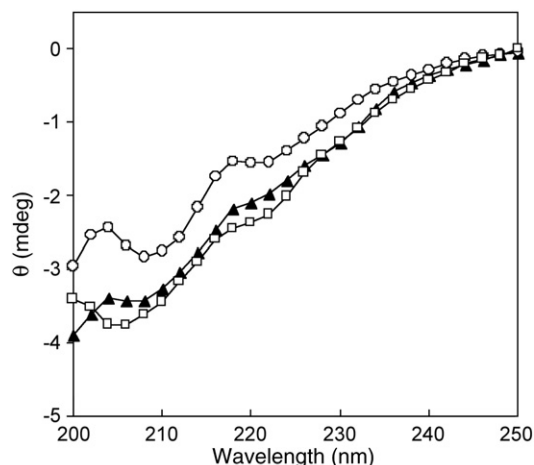


Fig. 2. Analysis by CD spectroscopy of HMWK–cathepsin B interactions. Far-UV CD spectra. Data acquisitions were made at 1-nm intervals (1 s dwell time) between 200 and 250 nm, at 37 °C, and averaged from repeated scans. HMWK (250 nM) was incubated with cathepsin B at molar ratio 1:1 for 5 min in 300 mM sodium phosphate, pH 5.5, containing 2 mM DTT at 37 °C, before recording (○). The same procedure was repeated in the absence of DTT (□). Individual CD spectrum of free HMWK was measured as control (▲). Spectra of HMWK corresponding to both HMWK/cathepsin B mixtures (in the presence of DTT, ○; in the absence of DTT: □) are presented after subtraction of the individual CD spectrum of cathepsin B.

dependent manner, the apparent lack of difference in the CD spectra observed after 5 and 60 min of incubation (data not shown) remains unexplained. It can be speculated that cleavage of HMWK within β -sheets of cystatin-like domains of its native heavy chain leads to a rapid and time-stable structural reorganization void of any further CD spectral changes.

His110Ala cathepsin B, but not wild-type cathepsin B, forms a tight-binding complex with kininogens

Both LMWK and HMWK serve as cathepsin B substrates in addition to weak inhibitors. This inability to strongly control cathepsin B activity appears to be due to the presence of the occluding loop, which is held in place by residues forming salt bridges.³⁰ Two residues in the occluding loop are of particular interest, His110 and His111. The His110Ala mutant exhibited increased occluding loop mobility as well as an improved endopeptidase activity, whereas the His111Ala cathepsin B lacked its peptidyl dipeptidase activity while the occluding loop remained in the closed position.³² HMWK was incubated with wild-type cathepsin B as well as both His110Ala and His111Ala mutants (inhibitory sites/enzyme molar ratio=4:1). The catalytically inactive recombinant form of cathepsin B (His110Ala/Cys29Ala), which is deprived of its nucleophilic residue, was used as a control in order to evaluate

the importance of the arrangement of the occluding loop in the absence of proteolytic cleavage. The His111Ala mutant processed HMWK similar to wild-type cathepsin B (Fig. 3). Conversely, no cleavage of HMWK by the His110Ala form was observed after 1 h of incubation. A similar pattern of proteolysis was observed for LMWK (data not shown). We further evaluated the ability of kininogens to form a stable, long-lasting complex with cathepsin B and its mutants by gel-filtration chromatography. However, experiments were conducted with LMWK rather than HMWK because of nonspecific electrostatic interactions between the light chain of HMWK and the column (Superdex 200). LMWK was eluted at the retention time expected from the calibration curve. When LMWK (120 nM) was incubated with either wild-type cathepsin B (30 nM) or the His111Ala mutant (30 nM) for 1 h prior to loading on Superdex 200, the enzymatic activity towards Z-Phe-Arg-AMC was fully recovered in fractions corresponding to the apparent molecular mass (M_r) of cathepsin B. In contrast, in a similar experiment with the His110Ala mutant, the fractions containing enzymatic activity eluted at a position corresponding to a higher M_r for cathepsin B (Fig. 4). Similarly, the maximal inhibitory activity of LMWK was observed in fractions corresponding to free LMWK ($M_r \sim 70$ kDa) for both wild-type cathepsin B/LMWK and His111Ala mutant/LMWK mixtures, but shifted to a lower elution volume (11–13 ml) for the His110Ala

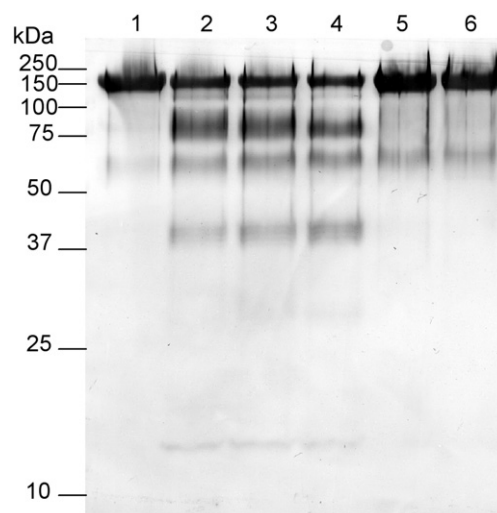


Fig. 3. Cleavage of HMWK by cathepsin B and its occluding loop mutants. HMWK was incubated in the presence of human liver cathepsin B, recombinant wild-type form, and its site-directed mutants at 37 °C for 1 h before running on a 12% SDS-PAGE under reducing conditions as previously described. Following transfer, polyclonal anti-HMWK antibody was used for immunodetection.⁵¹ Lane 1, HMWK; lane 2, human liver cathepsin B/HMWK; lane 3, recombinant wild-type cathepsin B/HMWK; lane 4, His111Ala cathepsin B/HMWK; lane 5, His110Ala cathepsin B/HMWK; lane 6, His110Ala/C29A cathepsin B/HMWK.

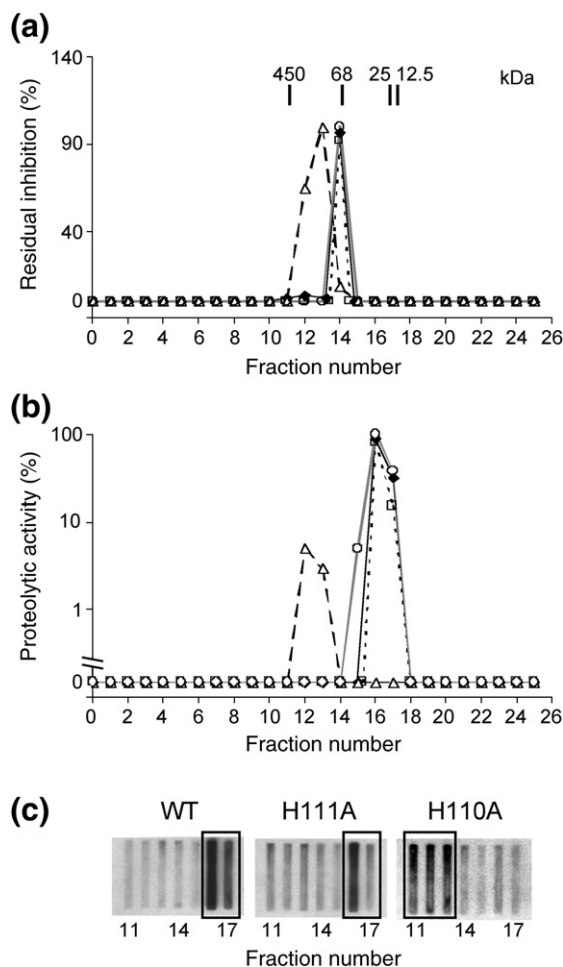


Fig. 4. His110Ala cathepsin B mutant forms a stable complex with kininogen. LMWK (120 nM) and wild-type cathepsin B or its site-directed mutants His1110Ala and His111Ala (inhibitory sites/cathepsin B molar ratio of 4:1) were incubated for 1 h at 37 °C in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5, containing 2 mM DTT, 2 mM EDTA, and 0.01% Brij 35 before gel-filtration analysis of complex-forming capabilities of LMWK with wild-type cathepsin B and its mutants ($\lambda_{220\text{ nm}}$). Residual inhibitory potential towards exogenous papain (a) and residual enzymatic activity (b) were measured for each fraction (1 ml) collected using Z-Phe-Arg-AMC as substrate. Fractions 11–17 were slot-blotted, and immunodetection was performed using an anti-human cathepsin B antibody (c). (○): LMWK, (◆): wild-type cathepsin B/LMWK, (□): His111Ala cathepsin B/LMWK, (△): His110Ala cathepsin B/LMWK.

mutant/LMWK mixture. Subsequent apparent masses (M_r range = ~90–120 kDa) are consistent with the presence of stable complexes between His110Ala cathepsin B and LMWK and may correspond to both 1:1 and 2:1 binding enzyme/inhibitor stoichiometry. In addition, immunodetection of His110Ala mutant by slot-blot analysis was shifted to earlier fractions compared to its parent molecule or His111Ala mutant, again supporting the formation of a tight-binding complex between His110Ala mutant and LMWK (Fig. 4c). The pre-

sence of the occluding loop that restricts access to the primed region of the cathepsin B active-site cleft was initially proposed to be responsible for the overall lower affinities of cystatins and stefins, compared with those endopeptidases with open active sites (such as cathepsin L²⁷) since partial deletion of the occluding loop of cathepsin B increased the inhibitory activity.³¹ The present data with kininogens support the above hypothesis.

Michaelis constants for hydrolysis of Z-Phe-Arg-AMC by cathepsin B and its mutant forms were measured, prior to determining the K_i values. K_m values varied from 180 μM for wild-type cathepsin B to 5 μM for His110Ala cathepsin B and to 21 μM for His111Ala cathepsin B. Apparent inhibition constants $K_{i(\text{app})}$ were further determined as described in Materials and Methods and K_i values deduced from Eq. (1) are reported in Table 1. Slightly enhanced inhibition by HMWK was observed for the His111Ala cathepsin B variant ($K_i = 12\text{ nM}$), while an ~20,000-fold increase of inhibition occurred for the His110Ala cathepsin B mutant ($K_i = 0.005\text{ nM}$) when compared to its wild-type form ($K_i = 100\text{ nM}$). As expected, K_i values for cathepsin B mutants were similar for LMWK. Potent inhibition of His110Ala cathepsin B by both kininogens accounts for the stability of the His110Ala cathepsin B/LMWK complex on gel filtration, which is in contrast to that observed for His111Ala and wild-type cathepsin B. Furthermore, the K_i values for the His110Ala cathepsin B variant were comparable to those reported for cathepsin L for both kininogens (Table 1). Association rate constants for the inhibition of His110Ala cathepsin B ($k_{\text{ass}} = 1.4 \times 10^6\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$) and cathepsin L ($k_{\text{ass}} = 6.0 \times 10^6\text{ M}^{-1}\text{ s}^{-1}$) by HMWK are similar, suggesting that the improved affinity of the cathepsin B mutant compared to the wild-type enzyme for kininogens mostly depends on the increase in k_{ass} favoring the formation of the inhibitory complex. Alternatively, the dissociation rate constant for the inhibition of His110Ala cathepsin B ($k_{\text{diss}} = 7.0 \times 10^{-6}\text{ s}^{-1}$) differs from that of cathepsin L ($k_{\text{diss}} = 1.2 \times 10^{-4}\text{ s}^{-1}$), suggesting that the presence of the loop in its open conformation partly stabilizes the complex and delays dissociation between the two partners. Previous studies have demonstrated that binding of both stefin A and cystatin C to wild-type cathepsin B is a two-step reaction, with a rate-limiting step corresponding to the displacement of the occluding loop.^{61,62} This is in contrast to papain and cathepsins L and S, which bind family 1 and 2 cystatins according to a one-step mechanism.^{63–66} Likewise, the present experimental kinetics values, corresponding to the tight-binding inhibition of His110Ala cathepsin B by both kininogens, strongly suggest that the disruption of the salt bridge between His110 and Asp22 results in increased mobility of the occluding loop and a subsequent improved accessibility to the active site as previously discussed in detail by Pavlova *et al.*³⁶ and Redzyna *et al.*,³⁵ leading to a single, one-step reaction mechanism similar to that observed for

Table 1. Inhibition of wild type and recombinant variants of cathepsin B by stefin B and kininogens

Cathepsin B	Stefin B	LMWK	HMWK		
	K_i (nM)	K_i (nM)	K_i (nM)	k_{ass} ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_{diss} (s^{-1})
Wild type (human liver)	4 ± 0.1	70 ± 6.5	100 ± 20	n.d.	n.d.
Recombinant wild type (<i>P. pastoris</i>)	2 ± 0.2	62 ± 10	107 ± 8	n.d.	n.d.
Mutant H110A	0.008 ± 0.002	0.009 ± 0.005	0.005 ± 0.002	$1.4 \pm 0.2 \times 10^6$	7×10^{-6a}
Mutant H111A	n.d.	27 ± 5	12 ± 2	n.d.	n.d.
Cathepsin L	0.0095^b	$0.017^c - 0.014^b$	$0.013^b - 0.019^d$	6.0×10^{6d}	1.2×10^{-4d}

n.d., not determined.

^a Deduced from Eq. (3).^b Taken from Ref. 33.^c Taken from Ref. 11.^d Taken from Ref. 9.

occluding loop-lacking cathepsins interacting with stefins and cystatins. Human stefin B, similarly to kininogens and their isolated inhibitory domains, binds tightly to papain and cathepsin L and more weakly to cathepsin B. Stefin B also has a lower affinity to cathepsin B than ovocystatin or stefin A.^{67,68} A dramatic increase in inhibition for the His110Ala cathepsin B mutant ($K_i = 8$ pM) was observed, compared to its wild-type form (K_i in the nanomolar range) (Table 1). Furthermore, the inhibitory potency for the His110Ala mutant is identical with that for cathepsin L, supporting the hypothesis that the occluding loop in the wild-type enzyme limits access to the active site and thus results in a greater K_i . Nevertheless K_i variations for stefin B between His110Ala cathepsin B *versus* its wild-type form (~ 200 - to 500 -fold difference) are less dramatic than those measured for both kininogens (~ 7000 - to $20,000$ -fold difference) and correspond to the K_i values reported in the literature for cystatins (families 1 and 2) with cathepsin L and cathepsin B.

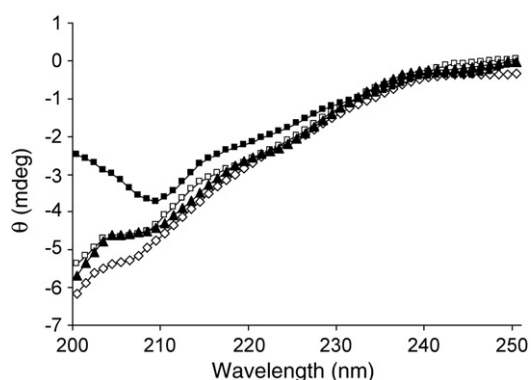


Fig. 5. Analysis of interactions between HMWK and cathepsin B and its mutants by CD. Far-UV CD spectra were obtained using 250 nM for both HMWK and enzyme in 300 mM sodium phosphate, pH 5.5, 2 mM DTT, at 37 °C, as described in Fig. 3. CD spectra of HMWK—corresponding to HMWK/cathepsin B (or its mutants) complexes—are reported after subtraction of the individual CD spectrum of cathepsin B (or its mutants). (◇): HMWK, (▲): wild-type cathepsin B/HMWK, (□): His111Ala cathepsin B/HMWK, (■): His110Ala cathepsin B/HMWK.

Complementary far-UV CD analyses were conducted. As described above, CD spectra of HMWK corresponding to HMWK/cathepsin B mixtures were reported after subtraction of the individual CD spectrum of wild-type cathepsin B. CD spectra of HMWK corresponding to both wild-type cathepsin B/HMWK and His111Ala cathepsin B/HMWK complexes were closely superimposable (Fig. 5). On the other hand, a notable increase attributable to β -structure ($\sim 39\%$) was observed for the His110Ala cathepsin B/HMWK complex. This most probably reflects rearrangements associated with the formation of a tight-binding complex, in contrast to His111Ala cathepsin B/HMWK and wild-type cathepsin B/HMWK that form weak inhibitory complexes.

Molecular modeling of kininogen inhibitory domains and of the D2 domain complexed with wild-type cathepsin B and occluding loop mutants

A molecular analysis was conducted in order to account in a qualitative manner for the experimentally observed inhibition profile of kininogens with wild-type cathepsin B and its two mutant forms. Since the three-dimensional structures of kininogens are not available, we built molecular models of the inhibitory cystatin-like D2 and D3 domains. The 3-D modeled D2 domain was then docked into cathepsin B and its His111Ala and His110Ala mutants for a comparative analysis.

Molecular modeling of both domains was conducted using human cystatin F [Protein Data Bank (PDB) ID: 2CH9⁶⁹] as template. The well-conserved protease binding segments, the flexible N-terminal part, and two hairpin loops, one in the central region (L1) (QXVXG) and another towards the C-terminal region L2 (PW), were aligned at the same position as cystatin F. Both HMWK and LMWK (family 3) harbor type 2 cystatin-like domains (D2 and D3) containing two intramolecular disulfide bonds at their C-termini. Alignment with the template structure places the Cys residues in close proximity to form a disulfide bond. Stepwise energy refinement of the initial complex generates a convincing model of the D2 domain of human kininogen (Fig. 6a).

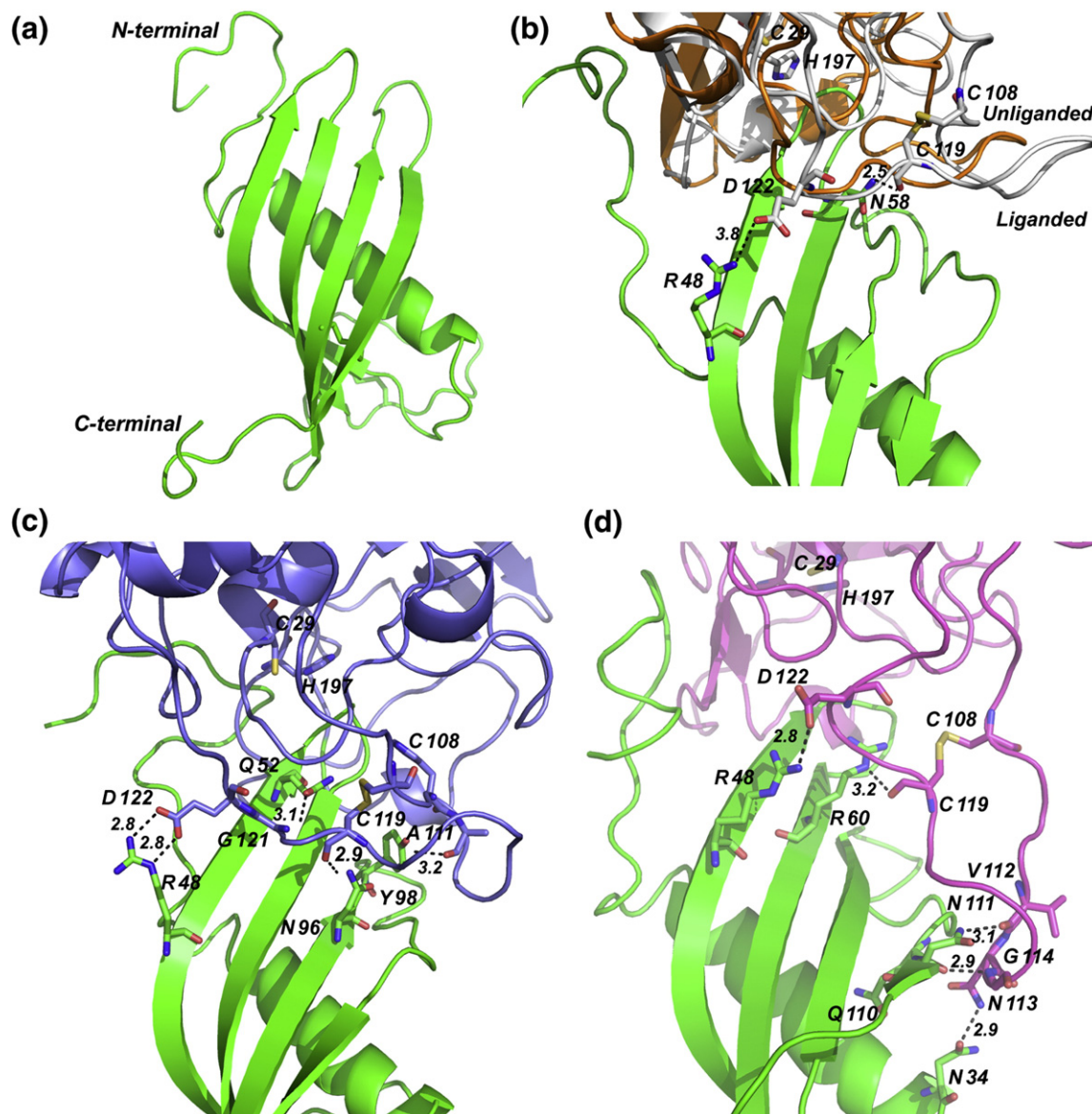


Fig. 6. Binding mode of the D2 cystatin-like domain to cathepsin B. The inhibitory cystatin-like domain of the heavy chain of human kininogens is shown in green. (a) Molecular model of the D2 domain. (b) Wild-type cathepsin B (white). (i) H-bond: backbone carbonyl of Cys119 and side chain of Asn58, (ii) conserved ionic interaction between Asp122 and Arg48. Unliganded wild-type cathepsin B is overlaid (brown) for reference. Bonds are depicted as broken lines. Distances are labeled in angstrom. (c) His111Ala mutant (violet). (i) H-bond: backbone amide of Gly121 and side chain of Gln52, (ii) H-bond: backbone carbonyl of Cys119 and side chain of Asn96, (iii) H-bond: backbone carbonyl of Ala111 and side chain of Tyr98, (iv) conserved ionic interaction between Asp122 and Arg48. (d) His110Ala mutant (magenta). (i) H-bond: backbone carbonyl of Cys119 and side chain of Arg60, (ii) H-bond: backbone carbonyl of Val112 and side chain of Asn111, (iii) H-bond: backbone amide of Gly114 and backbone carbonyl of Gln110, (iv) H-bond: side chain of Asn113 and side chain of Asn34, (v) conserved ionic interaction between Asp122 and Arg48. The D2 cystatin-like domain is shown in green.

From the Ramachandran plot, 89% of the residues are located within the most favored regions and 11% are located in additionally allowed regions. The modeled D2 domain retains the overall fold of template structures; a five-stranded antiparallel β -sheet wrapped around a five-turn α -helix, while the N-terminal β 1 structure was less preserved. The three conserved domains that form the typical tripartite 'wedge' shown in other cystatin crystal structures important for protease inhibition are also

preserved, consistent with its role as a functional CPI. A homology model of the D3 domain was also obtained (data not shown). In this model, three structurally conserved regions (SCRs) were built using the template. Separating the three SCRs are two structurally variable regions. L2 residues of the D3 domain showed excellent sequence identity with the template. Despite both the N- and C-terminal regions of the D3 kininogen domain showing better homology with the human cystatin F compared to

D2, the superposition of the energy-refined 3-D models of both kininogen domains and the template structure revealed similar protease binding sites.

In contrast to stefins and cystatins, cathepsin B cleaves HMWK close to the central consensus region (L1) of the D3 domain, but not the D2 domain. Thus, despite the D3 domain showing higher sequence identity with the template, we chose to further focus on the D2 domain for modeling complexes. Refinement of the complexes between the D2 domain and the three different forms of cathepsin B was carried out by MD simulations. Differences between the three complexes are illustrated with snapshots representing the MD average structure of the last 4 ns of each trajectory. Superimposition of the D2 domain complexed with wild-type, His111Ala, and His110Ala forms of cathepsin B, respectively, showed an overall similar global fold and exhibited significant differences in the loop regions (Supplementary Fig. 1a). The overall architecture and mode of binding of isolated D2 kininogen domain to cathepsin B, in agreement with the chicken cystatin structure determined by X-ray diffraction and NMR spectroscopy,⁷⁰ are characterized by the three well-conserved segments basically involved in the inhibitory mechanism with their target proteases: the flexible N-terminal portion, a hairpin loop (L1) at the central region that is conserved throughout the cystatin superfamily, and partly by another loop (L2) towards the C-terminus. The L1 (QVVAG) segment forms a wedge that enters the active site of cathepsin B near the catalytic cysteine residue. The occluding loop in the wild-type structure is only partially displaced, restricting complete access to the active-site cleft (Supplementary Fig. 1b). The L2 loop and adjacent β -strand of kininogen D2 are unable to bind to the active-site cleft and ultimately embrace the enzyme active site laterally. The N-terminal flexible region is partially solvent exposed and interacts with residues outside the active-site cavity. The incomplete entry of the binding regions of the D2 domain into the active-site cavity may explain why it inhibits wild-type cathepsin B with much lower affinity than other CPs. The MD simulation of the His111Ala mutant shows some differences with respect to the wild-type cathepsin B/D2 complex (Fig. 6b and c). The occluding loop is differently placed in the two structures. A number of electrostatic interactions occur between wild-type cathepsin B and the kininogen D2 domain; however, no H-bonds are observed between the residues of the occluding loop and residues of the D2 domain. On the other hand, an H-bond between the backbone carbonyl of Ala111 (cathepsin B) and the side-chain hydroxyl of Tyr98 (kininogen D2 domain) is formed in the His111Ala mutant/D2 complex. This strengthened interaction of the kininogen domain with His111Ala cathepsin B might participate to the fairly improved inhibition of His111Ala mutant by kininogens as compared to wild-type cathepsin B. His110 is responsible for anchoring the loop in occluding position in wild-type cathepsin B.³² The mutation His110Ala allows this occluding loop to

adopt an open conformation, allowing intimate interactions between the inhibitory domain and the active-site pocket of cathepsin B. In an MD snapshot representing the average structure of the complex, with respect to the wild type protein, residues of the occluding loop of His110Ala cathepsin B interact with the D2 domain through three supplementary H-bonds in addition to the conserved extended electrostatic interactions (see Fig. 6d).

Taken together, the weak kininogen-dependent inhibition of cathepsin B and its His111Ala cathepsin B variant, the lack of detectable complexed forms under mild chromatographic conditions (gel permeation), and their susceptibility to proteolysis by their target enzyme support the fact that kininogens primarily act as cathepsin B substrates. On the contrary, the disruption of a salt bridge through a single mutation (His110Ala cathepsin B variant) and the establishment of supplementary close contacts allow the recovery of tight-binding inhibition by both kininogens. The present data suggest that the occluding loop of cathepsin B (in particular the Asp22-His110 salt bridge), apart from its established role in discriminating between exopeptidase *versus* endopeptidase activities, is used to distinguish members of the three cystatin families and define its inhibitory profile.

Materials and Methods

Reagents

Z-Phe-Arg-AMC, AMC, and DTT were purchased from Bachem (Weil am Rhein, Germany). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). E-64 and CA-074 were obtained from Sigma-Aldrich (St. Quentin le Fallavier, France). Molecular weight calibration kits were from Bio-Rad (Ivry-sur-Seine, France).

Enzymes and inhibitors

Human wild-type recombinant procathepsin B and site-directed mutants (His110Ala, His111Ala, and His110Ala/C29A) were produced in the yeast *Pichia pastoris* and processed to the mature forms as described elsewhere.^{31,32,36} Cathepsin B purified from human liver was supplied by Calbiochem (VWR International, Libourne, France). Papain was obtained from Boehringer (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany). Cathepsins were activated in assay buffer, 100 mM sodium acetate, pH 5.5, containing 2 mM DTT and 2 mM EDTA for 5 min at 37 °C prior to kinetic assays [Kontron SFM25 spectrofluorimeter (λ_{ex} =350 nm; λ_{em} =460 nm)]. Cathepsins were active site titrated using E-64⁷¹ and Z-Phe-Arg-AMC as the substrate. Human LMWK and HMWK and human cystatin C were purchased from Calbiochem. Both kininogens and cystatin C were titrated with E-64-titrated commercial papain. Recombinant kininostatin, expressed in *Escherichia coli* and corresponding to domain 5 of HMWK (Lys438-Ser531), was purchased from R&D Systems Europe (Lille, France).

Proteolysis of kininogens by cathepsin B

HMWK (two cystatin-like inhibitory sites/molecule) was incubated with increasing concentrations of cathepsin B (120, 240, and 480 nM, corresponding to inhibitory sites/cathepsin B molar ratios of 4:1, 2:1, and 1:1 respectively), in 0.1 M sodium acetate, pH 5.5, containing 2 mM DTT, 2 mM EDTA, and 0.01% Brij 35 for 60 min at 37 °C (final volume: 10 µl). Reactions were stopped by addition of reducing SDS-PAGE sample buffer [40 mM Tris/HCl buffer, pH 6.8, containing 4% SDS (w/v), 33% glycerol (w/v), 10% 2-mercaptoethanol (w/v), and 0.002% Bromophenol Blue (w/v)]. Samples were boiled for 5 min and submitted to electrophoresis, using a (10–15%) gradient polyacrylamide gel system (PhastSystem Pharmacia; GE Healthcare Europe, Paris, France) and visualized by Coomassie blue staining. Preincubation of cathepsin B with E-64 (10 µM) was used as a control. Simultaneously, HMWK (480 nM) was incubated with cathepsin B (inhibitory sites/enzyme molar ratios of 4:1, 2:1, and 1:1, respectively) for 0–60 min at 37 °C in activity buffer (20 µl). Aliquots (2.5 µl) were removed, and the residual enzymatic activity was recorded in the presence of Z-Phe-Arg-AMC (20 µM) at 37 °C. Assays were carried out in triplicate. Controls were made using human cystatin C (10 µM) or E-64 (10 µM). Trials were also repeated under non-reducing conditions. Apart from wild-type cathepsin B, HMWK was incubated in the presence of site-directed mutants of cathepsin B (His111Ala, His110Ala, and His110Ala/Cys29Ala) using the same procedure. Assays were performed with LMWK (480 nM) and wild-type cathepsin B and its mutants under the same conditions. Alternatively, in order to assess the inhibitory potency of proteolysis products generated by wild-type cathepsin B, HMWK was incubated with cathepsin B (inhibitory sites/cathepsin B molar ratios of 4:1, 2:1, and 1:1 respectively) in the assay buffer at 37 °C for 1 h. After incubating cathepsin B with CA-074 (10 µM), we measured the inhibitory potential of HMWK towards cathepsin L (0.5 nM) using Z-Phe-Arg-AMC as described above. Preincubation of cathepsin B with CA074 was used as a control.

Detection and identification of cleavage sites

Rabbit anti-human HMWK was prepared as previously described.⁵¹ Goat anti-human kininostatin was supplied by R&D Systems Europe. Goat anti-rabbit IgG–peroxidase conjugate and rabbit anti-goat IgG–peroxidase conjugate were from Sigma-Aldrich. Wild-type cathepsin B (120 nM) was incubated with HMWK (480 nM) for 0–60 min at 37 °C in assay buffer. The reaction was quenched by the addition of reducing buffer, followed by incubation at 100 °C for 5 min. The cleavage products were separated by 12% SDS-PAGE under reducing conditions. After transfer onto a nitrocellulose sheet by semi-dry electrotransfer (2 h, 30 mA), the membrane was blocked with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% Tween 20 and 5% (w/v) dried milk for 1 h at room temperature. The membrane was in contact with anti-human HMWK (1:1000, in PBS, 0.1% Tween 20, and 5% dry milk) overnight at 4 °C, washed three times, and then incubated with goat anti-rabbit IgG–peroxidase conjugate (1:5000 in PBS, 0.1% Tween 20, and 5% dry milk) for 1 h at room temperature. Bands were visualized using the Renaissance 4 CN plus (4-chloro-1-naphthol) system (Perkin Elmer, Courtaboeuf, France). Immunodetection of kininostatin was performed by using goat anti-human kininostatin (1:100) and rabbit anti-goat IgG–peroxidase conjugate

(1:2000). For N-terminal sequencing of cleavage products, after incubating the kininogen/cathepsin B mixture (molar ratio 4:1) for 2 h at 37 °C, and separation by SDS-PAGE 12%, the products were immobilized onto a polyvinylidene fluoride membrane (Applied Biosystems Prosorb Inserts, Foster City, CA, USA), and analyzed with a Procise 491 automated amino acid sequencer (Applied Biosystems), as previously described.⁷²

Gel-filtration studies of the complex-forming capacity of HMWK with wild-type cathepsin B and its mutants

LMWK (120 nM) and wild-type cathepsin B (30 nM) were incubated together or separately for 1 h at 37 °C in 0.1 M sodium acetate, pH 5.5, containing 2 mM DTT, 2 mM EDTA, and 0.01% Brij 35. The mixture was then loaded on a size-exclusion chromatography Superdex 200 column (AKTA purifier 900 HPLC system, Amersham, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden), and the products eluted in the same buffer (0.4 ml/min, 1 ml fractions, $\lambda_{220\text{ nm}}$). The calibration curve was obtained using the standard proteins, ferritin (450 kDa), albumin (68 kDa), chymotrypsinogen (25 kDa), and cytochrome *c* (12.5 kDa). The same protocol was repeated with His111Ala and His110Ala mutants of cathepsin B. Residual enzymatic activity and residual inhibitory potential towards papain (1 nM) were recorded in the presence of Z-Phe-Arg-AMC. In addition, sample fractions were blotted onto nitrocellulose sheets (Cross-Blot system, Sebia, Issy-Les-Moulineaux, France) for 1 h at room temperature under gentle agitation. After blocking [PBS, 0.1% Tween 20, and 5% (w/v) dried milk for 1 h at room temperature], we performed visualization of wild-type cathepsin B and mutants using a rabbit anti-human cathepsin B antibody (dilution: 1/300) (Fitzgerald, Concord, MA, USA), while HMWK was detected by a rabbit anti-human HMWK (dilution: 1/1000).⁵¹ Enhanced chemiluminescence was used for detection (ECL Plus™ Western Blotting Detection, Amersham Biosciences).

Kinetic measurements

Assays were performed in 0.1 M sodium acetate, pH 5.5, containing 2 mM DTT, 2 mM EDTA, and 0.01% Brij 35 at 37 °C, using Z-Phe-Arg-AMC as substrate ($\lambda_{\text{ex}}=350\text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}}=460\text{ nm}$). Michaelis constant (K_m) for wild-type cathepsin B as well as for His110Ala and His111Ala mutants was determined as previously reported.⁷³ Inhibition constants $K_{i(\text{app})}$ were determined under experimental conditions that gave nonlinear dose–response curves as described elsewhere.⁷⁴ Data were plotted using the Easson and Stedman procedure as described by Bieth⁷⁵ and fitted with Enzfitter software (Biosoft, Cambridge). Enzyme concentration $[E_0]$ was at least 1- to 10-fold higher than the K_i value, and less than 5% of substrate (Z-Phe-Arg-AMC) was hydrolyzed during these experiments. Data are reported as means $\pm$ SD ($n=3$). K_i values were calculated from $K_{i(\text{app})}$ values according to Eq. (1):

$$K_i = K_{i(\text{app})} / (1 + S_0 / K_m) \quad (1)$$

The rate constant for association (k_{ass}) between His110Ala cathepsin B mutant and HMWK was determined by monitoring the time dependence of association of equimolar amounts of enzyme and inhibitor active sites (final concentration: 1 nM).⁷⁵ Aliquots were incubated

at 37 °C, and the residual activity was measured as a function of time after addition of Z-Phe-Arg-AMC (3.3 μM). Fractional activity was plotted against time according to Eq. (2):⁷⁵

$$1/[E] = k_{\text{ass}}t + 1/[E_0] \quad (2)$$

with $[E_0]$ being the initial enzyme concentration and $[E]$ being the enzyme concentration at time t . The rate constant for dissociation (k_{diss}) was calculated from the experimental values of K_i and k_{ass} , which are related to k_{diss} as follows:

$$k_{\text{diss}} = K_i \cdot k_{\text{ass}} \quad (3)$$

CD spectroscopy

CD spectra were obtained using a Jasco J-810 spectropolarimeter (Jasco France, Bouguenais, France) equipped with a Peltier thermostat system. The path length of the cell was 1 mm (Hellma, VWR). Wild-type HMWK was incubated with cathepsin B at molar ratio 1:1 for 5 and 60 min in 300 mM sodium phosphate, pH 5.5, containing 2 mM DTT at 37 °C. Data acquisitions were made at 1-nm intervals with a dwell time of 1 s between 200 and 250 nm, at 37 °C in the same buffer, and averaged from repeated scans. The same procedure was repeated in the absence of DTT. Individual CD spectra of wild-type cathepsin B and HMWK were measured as controls. Complexes between HMWK and site-directed cathepsin B mutants (His111Ala and His110Ala) were analyzed similarly. Secondary-structure content was assessed from CD measurements by computational analysis based on Kohonen's self-organizing maps: SOMCD.⁵⁹ The amino acid sequence of human HMWK was obtained from UniProtKB/Swiss-Prot (Uniprot-Swissprot ID: P01042), and its predicted secondary-structure content was estimated by using Jpred 3.⁶⁰

Homology modeling

3-D models were built by using MODELLER9v9 software.⁷⁶ The template structure was selected using the BLAST⁷⁷ server against the PDB. Fifty initial models of D2 and D3 kininogens were generated using the cystatin F crystal structure (PDB ID: 2CH9) as a template. Coordinates of four SCRs, four structurally variable regions (three deletion and one insertion), the N-terminus, and the C-terminus from the template were assigned to the target sequence based on the satisfaction of spatial restraints. All side-chain conformations of the model protein were set using a rotamer library. Finally, the top-ranked model of D2 and D3 was selected (MODELLER GA341 scoring method)⁷⁸ and then subjected to conjugate gradient energy minimization using a distance-dependent dielectric function ($\epsilon=4r$) and an 8-Å non-bonded cutoff up to an rms gradient of 0.01 kcal/mol-Å using the AMBER force field.⁷⁹ The final structures obtained were analyzed by Ramachandran map using PROCHECK.⁸⁰ These structures were used for docking into wild-type cathepsin B and the His110Ala and His111Ala mutants.

Protein-protein docking

The complex of D2 with the His110Ala mutant was modeled with the occluding loop in the open conformation, with the structure of cathepsin B taken from the

crystal structure of chagasin with His110Ala cathepsin B (PDB ID: 3CBJ).³⁵ ClusPro⁸¹ was used to dock D2 onto cathepsin B. ClusPro applies a series of filters to identify complexes with good surface complementarity and low desolvation energies and selects docked complexes with the broadest energy wells. Briefly, the top 20,000 complexes with the best shape complementarity are trimmed down to 2000 complexes based on electrostatic and desolvation free energies. These are then clustered and ranked according to their cluster size (default value of 9 Å as a radius of clustering) and subjected to a short energy minimization to relieve possible side-chain clashes. We used the top-ranked complex from ClusPro as the starting point for further refinement using MD (see below).

The complexes of D2 with wild-type cathepsin B and the His111Ala mutant were modeled with the occluding loop closed, with the structure of cathepsin B taken from a crystal structure with the small-molecule inhibitor CA030 (PDB ID: 1CSB).³³ The initial complexes were generated by manual docking using Sybyl (Tripos Inc., St. Louis, MO). The orientation of chagasin in its complex with His110Ala cathepsin B (PDB ID: 3CBJ) was used as a guide to position D2. Operationally, this was carried out by superposing the closed and open forms of cathepsin B and manually aligning the D2 structure with chagasin.

MD simulations

Refinement of the complexes between the D2 domain and the three different forms (wild type, His111Ala, and His110Ala, respectively) of cathepsin B was carried out by MD simulations. A corresponding energy-minimized model for each of the three complexes was used as a starting point for MD simulations using the AMBER ff03 force field in the AMBER 9 suite of programs.⁸² The protein was solvated in a truncated octahedron TIP3P water box. The solvated system was energy-minimized with harmonic restraints of 10 kcal mol⁻¹ Å⁻² on all solute atoms, followed by heating from 100 to 300 K over 25 ps in the canonical ensemble (NVT). Then, the solvent density was adjusted by running a 25-ps isothermal isobaric ensemble (NPT) simulation under 1 atm pressure. The harmonic restraints were then gradually reduced to zero with four rounds of 25-ps NPT simulations. After an additional 25-ps simulation, a 12-ns production NPT run was carried out with snapshots collected every 1 ps. For all simulations, a 2-fs time step and a 9-Å non-bonded cutoff were used. The particle mesh Ewald method was used to treat long-range electrostatic interactions,⁸³ and bond lengths involving bonds to hydrogen atoms were constrained by SHAKE.⁸⁴ After 7.5 ns, all three complexes seem to have equilibrated based on the RMSD fluctuations from the initial structures.

Acknowledgements

We acknowledge for their financial support the French cystic fibrosis association "Vaincre la Mucoviscidose" (VLM, France) (G.L.: Grant IC0810). C.N. holds a PhD grant from VLM. J.C.K. and J.S.M. are supported by the Shriners of North America. We are grateful to Daniel Bourry for his technical assistance (iconography facilities, Faculté de Médecine,

Université François Rabelais). We thank M. Brillard-Bourdet (INSERM U618) for N-terminal peptide sequencing and Dr P.K. Nandi (Infectiologie Animale et Santé Publique, Centre INRA de Tours, Nouzilly, France) for circular dichroism facilities and helpful comments.

Supplementary Data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.jmb.2010.06.006](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.06.006)

References

- Rawlings, N. D., Morton, F. R., Kok, C. Y., Kong, J. & Barrett, A. J. (2008). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* **36**, D320–D325.
- Abrahamson, M., Alvarez-Fernandez, M. & Nathanson, C. M. (2003). Cystatins. *Biochem. Soc. Symp.* 179–199.
- Turk, V. & Bode, W. (1991). The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett.* **285**, 213–219.
- Abrahamson, M., Ritonja, A., Brown, M. A., Grubb, A., Machleidt, W. & Barrett, A. J. (1987). Identification of the probable inhibitory reactive sites of the cysteine proteinase inhibitors human cystatin C and chicken cystatin. *J. Biol. Chem.* **262**, 9688–9694.
- Machleidt, W., Thiele, U., Laber, B., Assfalg-Machleidt, I., Esterl, A., Wiegand, G. *et al.* (1989). Mechanism of inhibition of papain by chicken egg white cystatin. Inhibition constants of N-terminally truncated forms and cyanogen bromide fragments of the inhibitor. *FEBS Lett.* **243**, 234–238.
- Esnard, F., Esnard, A., Faucher, D., Capony, J. P., Derancourt, J., Brillard, M. & Gauthier, F. (1990). Rat cystatin C: the complete amino acid sequence reveals a site for N-glycosylation. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **371**, 161–166.
- Laber, B., Krieglstein, K., Henschen, A., Kos, J., Turk, V., Huber, R. & Bode, W. (1989). The cysteine proteinase inhibitor chicken cystatin is a phosphoprotein. *FEBS Lett.* **248**, 162–168.
- Bhoola, K. D., Figueroa, C. D. & Worthy, K. (1992). Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.* **44**, 1–80.
- Muller-Esterl, W. (1987). Novel functions of the kininogens. *Semin. Thromb. Hemostasis*, **13**, 115–126.
- Lalmanach, G., Naudin, C., Lecaille, F. & Fritz, H. (2010). Kininogens: more than cysteine protease inhibitors and kinin precursors. *Biochimie*, in press (DOI information: [10.1016/j.biochi.2010.03.011](https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.03.011)).
- Salvesen, G., Parkes, C., Abrahamson, M., Grubb, A. & Barrett, A. J. (1986). Human low-M_r kininogen contains three copies of a cystatin sequence that are divergent in structure and in inhibitory activity for cysteine proteinases. *Biochem. J.* **234**, 429–434.
- Vogel, R., Assfalg-Machleidt, I., Esterl, A., Machleidt, W. & Muller-Esterl, W. (1988). Proteinase-sensitive regions in the heavy chain of low molecular weight kininogen map to the inter-domain junctions. *J. Biol. Chem.* **263**, 12661–12668.
- Lopez-Otin, C. & Bond, J. S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J. Biol. Chem.* **283**, 30433–30437.
- Turk, V., Turk, B. & Turk, D. (2001). Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J.* **20**, 4629–4633.
- Brix, K., Dunkhorst, A., Mayer, K. & Jordans, S. (2008). Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie*, **90**, 194–207.
- Chapman, H. A., Riese, R. J. & Shi, G. P. (1997). Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu. Rev. Physiol.* **59**, 63–88.
- Lecaille, F., Kaleta, J. & Bromme, D. (2002). Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem. Rev.* **102**, 4459–4488.
- Mohamed, M. M. & Sloane, B. F. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Rev., Cancer*, **6**, 764–775.
- Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev., Drug Discov.* **5**, 785–799.
- Vasiljeva, O., Reinheckel, T., Peters, C., Turk, D., Turk, V. & Turk, B. (2007). Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr. Pharm. Des.* **13**, 387–403.
- Mladenovic, M., Junold, K., Fink, R. F., Thiel, W., Schirmeister, T. & Engels, B. (2008). Atomistic insights into the inhibition of cysteine proteases: first QM/MM calculations clarifying the regiospecificity and the inhibition potency of epoxide- and aziridine-based inhibitors. *J. Phys. Chem. B*, **112**, 5458–5469.
- Nagler, D. K. & Menard, R. (1998). Human cathepsin X: a novel cysteine protease of the papain family with a very short proregion and unique insertions. *FEBS Lett.* **434**, 135–139.
- Barrett, A. J. & Kirschke, H. (1981). Cathepsin B, cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol.* **80**, 535–561.
- Mort, J. S. & Buttle, D. J. (1997). Cathepsin B. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 715–720.
- Cygler, M., Sivaraman, J., Grochulski, P., Coulombe, R., Storer, A. C. & Mort, J. S. (1996). Structure of rat procathepsin B: model for inhibition of cysteine protease activity by the proregion. *Structure*, **4**, 405–416.
- Jia, Z., Hasnain, S., Hirama, T., Lee, X., Mort, J. S., To, R. & Huber, C. P. (1995). Crystal structures of recombinant rat cathepsin B and a cathepsin B-inhibitor complex. Implications for structure-based inhibitor design. *J. Biol. Chem.* **270**, 5527–5533.
- Musil, D., Zucic, D., Turk, D., Engh, R. A., Mayr, I., Huber, R. *et al.* (1991). The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J.* **10**, 2321–2330.
- Turk, D., Podobnik, M., Kuhelj, R., Dolinar, M. & Turk, V. (1996). Crystal structures of human pro-cathepsin B at 3.2 and 3.3 angstroms resolution reveal an interaction motif between a papain-like cysteine protease and its propeptide. *FEBS Lett.* **384**, 211–214.
- Turk, D., Podobnik, M., Popovic, T., Katunuma, N., Bode, W., Huber, R. & Turk, V. (1995). Crystal structure of cathepsin B inhibited with CA030 at 2.0-Å resolution: a basis for the design of specific epoxysuccinyl inhibitors. *Biochemistry*, **34**, 4791–4797.
- Nagler, D. K., Storer, A. C., Portaro, F. C., Carmona, E., Juliano, L. & Menard, R. (1997). Major increase in endopeptidase activity of human cathepsin B upon removal of occluding loop contacts. *Biochemistry*, **36**, 12608–12615.

31. Illy, C., Quraishi, O., Wang, J., Purisima, E., Vernet, T. & Mort, J. S. (1997). Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *J. Biol. Chem.* **272**, 1197–1202.
32. Krupa, J. C., Hasnain, S., Nagler, D. K., Menard, R. & Mort, J. S. (2002). S2' substrate specificity and the role of His110 and His111 in the exopeptidase activity of human cathepsin B. *Biochem. J.* **361**, 613–619.
33. Lecaille, F., Bromme, D. & Lalmanach, G. (2008). Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie*, **90**, 208–226.
34. Nagler, D. K., Zhang, R., Tam, W., Sulea, T., Purisima, E. O. & Menard, R. (1999). Human cathepsin X: a cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochemistry*, **38**, 12648–12654.
35. Redzyna, I., Ljunggren, A., Abrahamson, M., Mort, J. S., Krupa, J. C., Jaskolski, M. & Bujacz, G. (2008). Displacement of the occluding loop by the parasite protein, chagasin, results in efficient inhibition of human cathepsin B. *J. Biol. Chem.* **283**, 22815–22825.
36. Pavlova, A., Krupa, J. C., Mort, J. S., Abrahamson, M. & Bjork, I. (2000). Cystatin inhibition of cathepsin B requires dislocation of the proteinase occluding loop. Demonstration by release of loop anchoring through mutation of his110. *FEBS Lett.* **487**, 156–160.
37. Turk, B., Stoka, V., Bjork, I., Boudier, C., Johansson, G., Dolenc, I. *et al.* (1995). High-affinity binding of two molecules of cysteine proteinases to low-molecular-weight kininogen. *Protein Sci.* **4**, 1874–1880.
38. Turk, B., Stoka, V., Turk, V., Johansson, G., Cazzulo, J. J. & Bjork, I. (1996). High-molecular-weight kininogen binds two molecules of cysteine proteinases with different rate constants. *FEBS Lett.* **391**, 109–112.
39. Alvarez-Fernandez, M., Liang, Y. H., Abrahamson, M. & Su, X. D. (2005). Crystal structure of human cystatin D, a cysteine peptidase inhibitor with restricted inhibition profile. *J. Biol. Chem.* **280**, 18221–18228.
40. Bode, W., Engh, R., Musil, D., Thiele, U., Huber, R., Karshikov, A. *et al.* (1988). The 2.0 Å x-ray crystal-structure of chicken egg-white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *EMBO J.* **7**, 2593–2599.
41. Jenko, S., Dolenc, I., Guncar, G., Dobersek, A., Podobnik, M. & Turk, D. (2003). Crystal structure of stefin A in complex with cathepsin H: N-terminal residues of inhibitors can adapt to the active sites of endo- and exopeptidases. *J. Mol. Biol.* **326**, 875–885.
42. Stubbs, M. T., Laber, B., Bode, W., Huber, R., Jerala, R., Lenarcic, B. & Turk, V. (1990). The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. *EMBO J.* **9**, 1939–1947.
43. Berdowska, I. (2004). Cysteine proteases as disease markers. *Clin. Chim. Acta*, **342**, 41–69.
44. Lenarcic, B., Gabrijelcic, D., Rozman, B., Drobnic-Kosorok, M. & Turk, V. (1988). Human cathepsin B and cysteine proteinase inhibitors (CPIs) in inflammatory and metabolic joint diseases. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **369**, 257–261.
45. Takeda, A., Nakamura, Y. & Aoki, Y. (1992). Enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of cathepsin-kininogen complexes in human plasma. *J. Immunol. Methods*, **147**, 217–223.
46. Lalmanach, G., Diot, E., Godat, E., Lecaille, F. & Herve-Grepinet, V. (2006). Cysteine cathepsins and caspases in silicosis. *Biol. Chem.* **387**, 863–870.
47. Perdureau, C., Godat, E., Maurel, M. C., Hazouard, E., Diot, E. & Lalmanach, G. (2006). Cysteine cathepsins in human silicotic bronchoalveolar lavage fluids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1762**, 351–356.
48. Serveau-Avesque, C., Martino, M. F., Herve-Grepinet, V., Hazouard, E., Gauthier, F., Diot, E. & Lalmanach, G. (2006). Active cathepsins B, H, K, L and S in human inflammatory bronchoalveolar lavage fluids. *Biol. Cell*, **98**, 15–22.
49. Veillard, F., Lecaille, F. & Lalmanach, G. (2008). Lung cysteine cathepsins: intruders or unorthodox contributors to the kallikrein-kinin system? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 1079–1094.
50. Turk, V., Stoka, V. & Turk, D. (2008). Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance. *Front. Biosci.* **13**, 5406–5420.
51. Lalmanach, G., Hoebeke, J., Moreau, T., Ferrer-Di Martino, M. & Gauthier, F. (1992). An immunochemical approach to investigating the mechanism of inhibition of cysteine proteinases by members of the cystatin superfamily. *J. Immunol. Methods*, **149**, 197–205.
52. Lenarcic, B., Krasovec, M., Ritonja, A., Olafsson, I. & Turk, V. (1991). Inactivation of human cystatin C and kininogen by human cathepsin D. *FEBS Lett.* **280**, 211–215.
53. Lim, I. T., Meroueh, S. O., Lee, M., Heeg, M. J. & Mobashery, S. (2004). Strategy in inhibition of cathepsin B, a target in tumor invasion and metastasis. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 10271–10277.
54. Barros, N. M., Tersariol, I. L., Oliva, M. L., Araujo, M. S., Sampaio, C. A., Juliano, L. & Motta, G. (2004). High molecular weight kininogen as substrate for cathepsin B. *Biol. Chem.* **385**, 551–555.
55. Moreau, T., Gutman, N., Faucher, D. & Gauthier, F. (1989). Limited proteolysis of T-kininogen (thiostatin). Release of comparable fragments by different endopeptidases. *J. Biol. Chem.* **264**, 4298–4303.
56. Katunuma, N. & Kominami, E. (1986). Distributions and localizations of lysosomal cysteine proteinases and cystatins. In *Cysteine Proteinases and Their Inhibitors* (Turk, V., ed.), pp. 219–227, Walter de Gruyter & Co, Berlin, Germany.
57. Gauthier, F., Gutman, N., Moreau, T. & el Moujahed, A. (1988). Possible relationship between the restricted biological function of rat T kininogen (thiostatin) and its behaviour as an acute phase reactant. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, **369**, 251–255.
58. Desmazes, C., Gauthier, F. & Lalmanach, G. (2001). Cathepsin L, but not cathepsin B, is a potential kininogenase. *Biol. Chem.* **382**, 811–815.
59. Unneberg, P., Merelo, J. J., Chacon, P. & Moran, F. (2001). SOMCD: method for evaluating protein secondary structure from UV circular dichroism spectra. *Proteins*, **42**, 460–470.
60. Cole, C., Barber, J. D. & Barton, G. J. (2008). The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* **36**, W197–201.
61. Estrada, S., Pavlova, A. & Bjork, I. (1999). The contribution of N-terminal region residues of cystatin A (stefin A) to the affinity and kinetics of inhibition of papain, cathepsin B, and cathepsin L. *Biochemistry*, **38**, 7339–7345.
62. Nycander, M., Estrada, S., Mort, J. S., Abrahamson, M. & Bjork, I. (1998). Two-step mechanism of inhibition of cathepsin B by cystatin C due to displacement of the proteinase occluding loop. *FEBS Lett.* **422**, 61–64.
63. Bjork, I., Brieditis, I., Raub-Segall, E., Pol, E., Hakansson, K. & Abrahamson, M. (1996). The importance of the second hairpin loop of cystatin C

- for proteinase binding. Characterization of the interaction of Trp-106 variants of the inhibitor with cysteine proteinases. *Biochemistry*, **35**, 10720–10726.
64. Estrada, S., Olson, S. T., Raub-Segall, E. & Bjork, I. (2000). The N-terminal region of cystatin A (stefin A) binds to papain subsequent to the two hairpin loops of the inhibitor. Demonstration of two-step binding by rapid-kinetic studies of cystatin A labeled at the N-terminus with a fluorescent reporter group. *Protein Sci.* **9**, 2218–2224.
 65. Lindahl, P., Abrahamson, M. & Bjork, I. (1992). Interaction of recombinant human cystatin C with the cysteine proteinases papain and actinidin. *Biochem. J.* **281**, 49–55.
 66. Turk, B., Colic, A., Stoka, V. & Turk, V. (1994). Kinetics of inhibition of bovine cathepsin S by bovine stefin B. *FEBS Lett.* **339**, 155–159.
 67. Abrahamson, M., Barrett, A. J., Salvesen, G. & Grubb, A. (1986). Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. *J. Biol. Chem.* **261**, 11282–11289.
 68. Barrett, A. J., Rawlings, N. D., Davies, M. E., Machleidt, W., Salvesen, G. & Turk, V. (1986). Cysteine proteinase inhibitors of the cystatin superfamily. In *Proteinase Inhibitors* (Barrett, A. J. & Salvesen, G., eds), vol. 12, pp. 515–569. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
 69. Schuttelkopf, A. W., Hamilton, G., Watts, C. & van Aalten, D. M. (2006). Structural basis of reduction-dependent activation of human cystatin F. *J. Biol. Chem.* **281**, 16570–16575.
 70. Engh, R. A., Dieckmann, T., Bode, W., Auerswald, E. A., Turk, V., Huber, R. & Oschkinat, H. (1993). Conformational variability of chicken cystatin. Comparison of structures determined by X-ray diffraction and NMR spectroscopy. *J. Mol. Biol.* **234**, 1060–1069.
 71. Barrett, A. J., Kembhavi, A. A., Brown, M. A., Kirschke, H., Knight, C. G., Tamai, M. & Hanada, K. (1982). L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem. J.* **201**, 189–198.
 72. Linke, T., Ross, A. C. & Harrison, E. H. (2006). Proteomic analysis of rat plasma by two-dimensional liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr., A*, **1123**, 160–169.
 73. Lecaille, F., Weidauer, E., Juliano, M. A., Bromme, D. & Lalmanach, G. (2003). Probing cathepsin K activity with a selective substrate spanning its active site. *Biochem. J.* **375**, 307–312.
 74. Moreau, T., Gutman, N., el Moujahed, A., Esnard, F. & Gauthier, F. (1986). Relationship between the cysteine-proteinase-inhibitory function of rat T kininogen and the release of immunoreactive kinin upon trypsin treatment. *Eur. J. Biochem.* **159**, 341–346.
 75. Bieth, J. G. (1980). Pathophysiological interpretation of kinetic constants of protease inhibitors. *Bull. Eur. Physiopathol. Respir.* **16**, 183–197.
 76. Sali, A. & Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**, 779–815.
 77. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410.
 78. John, B. & Sali, A. (2003). Comparative protein structure modeling by iterative alignment, model building and model assessment. *Nucleic Acids Res.* **31**, 3982–3992.
 79. Cornell, W. D., Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, K. M., Ferguson, D. M. et al. (1995). A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 5179–5197.
 80. Laskowski, R. A., Macarthur, M. W., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK—a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283–291.
 81. Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S. & Camacho, C. J. (2004). ClusPro: an automated docking and discrimination method for the prediction of protein complexes. *Bioinformatics*, **20**, 45–50.
 82. Case, D. A., Cheatham, T. E., 3rd, Darden, T., Gohlke, H., Luo, R., Merz, K. M., Jr et al. (2005). The Amber biomolecular simulation programs. *J. Comput. Chem.* **26**, 1668–1688.
 83. Darden, T., York, D. & Pedersen, L. (1993). Particle mesh Ewald—an $n \log(n)$ method for ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* **98**, 10089–10092.
 84. Ryckaert, J. P., Ciccotti, G. & Berendsen, H. J. C. (1977). Numerical integration of cartesian equations of motion of a system with constraints—molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys.* **23**, 327–341.

3. Régulation de la protéine du surfactant, SP-A, par les cathepsines

Regulation of antimicrobial properties of pulmonary surfactant protein SP-A by cathepsin S
F. Lecaille*, C. Naudin*, J. Sage, A. Courty, R. Veldhuizen, F. Possmayer & G. Lalmanach
(*contributions égales des auteurs)

Article en préparation

3.1. Introduction

La mucoviscidose (CF pour *cystic fibrosis*) est une pathologie héréditaire due à la mutation du gène CFTR (CF *transmembrane conductance regulator*) qui conduit à une production anormale du mucus (surproduction et viscosité accrue) et une inflammation chronique des voies respiratoires. L'inflammation pulmonaire se caractérise par le recrutement de cellules de l'immunité comme les neutrophiles et les macrophages. Ces cellules sécrètent des enzymes protéolytiques sous-régulées par leurs inhibiteurs, ce qui a pour conséquence la dégradation des tissus bronchiques, la détérioration de la fonction respiratoire mais également l'altération des mécanismes de défense antimicrobiens. Associées à l'inflammation, les patients CF présentent des infections par de nombreux pathogènes dont les plus fréquents sont *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae*.

Le surfactant pulmonaire joue un rôle critique dans l'intégrité des poumons grâce à ses propriétés physiques et immunologiques. Le surfactant, principalement synthétisé par les pneumocytes de type II, est constitué d'un mélange complexe multifonctionnel de lipides et de protéines qui tapisse les alvéoles pulmonaires. Les protéines hydrophobes SP-B et SP-C, avec les lipides du surfactant, forment un film qui diminue la tension de surface tout en permettant l'échange de molécules à l'interface air-liquide. A côté de ses propriétés biophysiques, le surfactant est également composé de deux protéines hydrophiles, les collectines SP-A et SP-D, qui participent activement à la défense antibactérienne des poumons. En effet, les souris déficientes en SP-A et SP-D présentent une faible clairance des pathogènes ainsi qu'une augmentation de l'inflammation après l'exposition bactérienne. SP-A est une glycoprotéine constituée de 18 chaînes polypeptidiques de 34kDa chacune. SP-A

interagit avec de nombreux micro-organismes que ce soit des bactéries, des virus ou bien encore des champignons, dont les pathogènes colonisant les poumons des patients CF. La fixation des pathogènes par SP-A induit leur agglutination, augmente la perméabilité membranaire conduisant à la lyse du pathogène, ou bien encore facilite leur phagocytose par opsonisation. SP-A est également capable de se lier aux cellules régulant ainsi la sécrétion de médiateurs de l'inflammation. Chaque chaîne polypeptidique de SP-A est constituée de 4 régions : un segment N-terminal impliqué dans la polymérisation des monomères via des ponts disulfures interchaînes, une région de type collagène pouvant interagir avec des récepteurs cellulaires, une région de coude et un domaine lectine de type C dit CRD (pour *carbohydrate recognition domain*). Le domaine CRD, sous la dépendance du calcium, permet de lier les sucres des glycoconjugués présents à la surface des pathogènes. Le domaine CRD permet également la fixation de certains phospholipides dont le dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) qui est le lipide le plus abondant du surfactant.

Les études précédentes révèlent une altération des protéines du surfactant pulmonaire dont SP-A chez les patients CF. SP-A est globalement retrouvé diminué chez les patients CF, jeunes ou adultes, en présence ou non d'infections bactériennes, comme à *Pseudomonas aeruginosa* par exemple (Griese *et al.*, 2004; Noah *et al.*, 2003). De plus, des fragments protéolytiques de SP-A sont retrouvés ce qui suggère l'intervention d'enzymes protéolytiques (von Bredow *et al.*, 2001). En effet, SP-A est dégradé par les protéases de *Pseudomonas aeruginosa*, l'élastase et la protéase IV, ce qui entraîne la perte de ses propriétés antimicrobiennes (Alcorn & Wright, 2004; Malloy *et al.*, 2005; Mariencheck *et al.*, 2003). A côté de ces protéases d'origine bactérienne, les protéases à sérine du neutrophile humain, et en particulier l'élastase, sont également capables de dégrader le SP-A (Rubio *et al.*, 2004).

Dans cette présente étude, nous avons cherché à déterminer l'implication potentielle des cathepsines à cystéine, en particulier les cathepsines B, L, K et S, dans le défaut en SP-A observé chez les patients CF. Des études antérieures ont révélé que ces protéases sont présentes, actives et sous-régulées par leurs inhibiteurs endogènes chez les patients CF (Naudin *et al.*, 2011; Taggart *et al.*, 2003). Par conséquent, les cathepsines à cystéine pourraient participer à la physiopathologie de la maladie, et en particulier réguler les propriétés du SP-A par clivage comme c'est le cas pour d'autres peptides ou protéines antimicrobiens (Rogan *et al.*, 2004; Taggart *et al.*, 2003, 2001).

3.2. Matériel et méthodes

3.2.1. Enzymes et inhibiteurs

Les cathepsines B, L, H et S humaines proviennent de Calbiochem (VWR International, Libourne, France), alors que la cathepsine K recombinante humaine produite dans *Pichia pastoris* est un don du Pr Dieter Brömme (University of British Columbia, Vancouver, Canada). La concentration en cathepsines actives est préalablement déterminée par titrage de leur site actif à l'aide d'E-64 (Barrett *et al.*, 1982). Les inhibiteurs L-trans-époxy succinyl-leucylamido-(-4-guanidino) butane (E-64), méthylméthanethiosulfonate (MMTS), pepstatine A, phénylméthanésulfonyl fluoride (PMSF), et le mannanase proviennent de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Le morpholine urea-Leu-homophénylalanine-(vinylsulfonyl)benzène (Mu-Leu-Hph-VSPH) est un don du Pr J.H. McKerrow (University of California, San Francisco, CA, USA). L'acide éthylène diamine tétracétique (EDTA) est fourni par Merck (Darmstadt, Allemagne). Le DL-dithiothreitol (DTT) provient de Bachem (Weil am Rhein, Allemagne).

3.2.2. Collection d'expectorations

Les expectorations (n = 25) ont été collectées à l'hôpital de Besançon (CHU Jean Minjoz, France). Les paramètres cliniques des patients sont les suivants : âge 27,1 ans +/- 9,4 ; volume d'expiration forcé (FEV) 2,0 L +/- 0,9 ; index de masse corporelle (ou BMI) 20,4 +/- 2,8 (moyenne +/- déviation standard). Après collecte, les expectorations sont divisées en deux, la première partie étant pour l'analyse bactériologique pour identifier et quantifier les bactéries pathogènes et la seconde est immédiatement congelée à -80°C pour utilisation ultérieure. Après réception, les expectorations sont reprises en tampon avec cocktail inhibiteur (tampon acétate de sodium, 0,1 M, pH 5,5 avec EDTA 0,5 mM, PMSF 0,5 mM, Pepstatine A 40 µM et MMTS 1 mM) comme décrit précédemment (Naudin *et al.*, 2011).

3.2.3. SP-A et bactéries

Le SP-A est purifié à partir de lavage pulmonaire de patients atteints de protéinose selon la méthode décrite par Bailey *et al.* (Bailey *et al.*, 2006). Les lavages sont centrifugés à 150 g pendant 10 minutes afin d'éliminer les débris cellulaires puis à 40 000 g pendant 15 minutes. Le culot est récupéré en NaCl 0,9 % et mélangé avec du 1-butanol avant d'être centrifugé à

5 000 g pendant 30 minutes et séché sous azote. Le culot est ensuite homogénéisé en tampon HEPES 10 mM, pH 7,4, n-octyl-D-glucopyranoside (OGP) 20 mM et centrifugé à 210 000 g pendant 30 minutes. Le culot est resuspendu dans ce même tampon et dialysé en tampon Tris-HCl 5 mM pendant une nuit à 4°C. Pour finir, le SP-A purifié est concentrée à 3 mg/ml et stocké à -20°C.

La souche *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 est un don du Professeur Agnès Rosenau (Laboratoire de Microbiologie, Université F. Rabelais, Tours, France) et la souche *Escherichia coli* ATCC 43745 (*E. coli* J5) provient de LGC Standards (Molsheim, France).

3.2.4. Immunodétection du SP-A dans les expectorations CF

Les surnageants d'expectorations (30 µg de protéines) sont dilués dans du tampon de Laemmli en conditions réductrices, bouillis 5 minutes, puis soumis à une électrophorèse SDS-PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*) sur un gel 15 % à 25 mA pendant 1 heure. En parallèle, un témoin SP-A purifié (150 ng) est déposé dans les mêmes conditions. Après migration, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Hybond-ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK), pendant 2 heures à 30 mA en tampon de transfert (pH 8,8, Tris 48 mM, glycine 39 mM, SDS 0.0375 %, méthanol 20 %) avec un system de transfert liquide (Mini Trans-Blot®, BIO-RAD, France). Après saturation en PBS (*phosphate buffered saline*), lait en poudre 5 % (w/v), pendant 1 heure, la membrane est incubée avec l'anticorps de lapin anti-SP-A fourni par Ruud Veldhuizen (University of Western Ontario, London, Canada), dilué au 1 : 2500 dans du PBS, Tween 20 0,1 %, lait 5 %, sur la nuit à 4°C. Après 3 lavages en PBS, Tween 20 0,1 %, la membrane est incubée avec l'anticorps anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase HRP (*horseradish peroxidase*) (Sigma-Aldrich), dilué au 1 : 5000, pendant 1 heure à température ambiante puis lavée 3 fois. La révélation est ensuite réalisée par chimioluminescence (ECL Plus Western Blotting Detection system, Amersham).

3.2.5. Hydrolyse du SP-A exogène dans les expectorations CF

SP-A (150 ng) est incubé à 37°C avec 5 µl de surnageant en tampon acétate de sodium, 0,1 M, pH 5,5, (0 à 8 heures) ou en tampon phosphate de sodium 0,1 M, pH 7,4, (0 à 4 heures) avec EDTA 2 mM, PMSF 0,5 mM, Pepstatine A 40 µM, Brij 35 0,01 % et DTT 4 mM (volume final 16 µl). Après ajout du tampon échantillon réducteur et avoir été bouillies, les

incubations sont soumises à une électrophorèse SDS-PAGE 15 %, un transfert et les protéines sont révélées comme précédemment. En témoin, les surnageants sont déposés sans SP-A exogène ou pré-incubés en présence de E-64 (10 μ M) ou de Mu-Leu-Hph-VSPh (10 μ M).

3.2.6. Dégradation du SP-A par les cathepsines

SP-A (3 μ g) est incubé avec des concentrations croissantes (0 à 200 nM) en cathepsines B, H, K, L et S en tampon acétate de sodium, 0,1 M, pH 5,5, DTT 2 mM, Brij 35 0,01 % pendant 10 minutes à 37°C. Les produits d'hydrolyse sont ensuite révélés par électrophorèse 15 % en conditions réductrices et coloration au bleu de Coomassie. Un témoin E-64 est réalisé par pré-incubation des cathepsines avec l'inhibiteur avant l'ajout du SP-A.

3.2.7. Détermination des sites de clivage par la cathepsine S

SP-A (3 μ g) est incubé avec la cathepsine S (10 nM) en tampon acétate de sodium, 0,1 M, pH 5,5, DTT 2 mM, Brij 35 0,01 % pendant 10 minutes à 37°C. L'incubation est soumise à une électrophorèse SDS-PAGE 15 % en conditions réductrices pendant 1 heure à 25 mA. Puis les protéines sont transférées sur une membrane de polyvinylidène fluoride activée au méthanol (Prosorb Inserts, Applied Biosystems, France) pendant 2 heures à 30 mA en tampon de transfert avec un système de transfert semi-sec (TransBlot, BIO-RAD, France). La glycine est ensuite retirée en lavant la membrane 3 fois à l'eau ultra-pure. Après coloration des bandes au bleu de Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma-Aldrich) pendant 1 minute en méthanol 40 %, acide acétique 1 %, la membrane est lavée en méthanol 50 % puis à l'eau et enfin séchée. Pour finir, les bandes sont découpées et analysées selon la méthode d'Edman par séquençage N-terminal (Procise 491 automated amino acid sequencer, Applied Biosystems).

3.2.8. Modélisation moléculaire du SP-A humain

La prédiction de la structure 3D du SP-A humain (numéro d'accèsion Q8IWL2, Protein Knowledgebase, UniProtKB) a été réalisée avec la méthode de modélisation comparative selon les contraintes spatiales à l'aide du serveur 3D-JIGSAW (www.bmm.icnet.uk/~3djigsaw). Le SP-A de rat (code PDB 1R14, Protein Data Bank) a servi de modèle et a été aligné avec la séquence du SP-A humain à l'aide du programme d'alignement multiple de séquences CLUSTAL W (1.83) (Thompson *et al.*, 1994). La

représentation en style cartoon a été faite avec le programme de modélisation Visual Molecular Dynamics (Humphrey *et al.*, 1996).

3.2.9. Colocalisation de la cathepsine S et du SP-A par immunohistochimie

Nous disposons de coupes de 3,5 µm de tissu pulmonaire au niveau alvéolaire de patients sains. Elles ont été fixées au paraformaldéhyde, paraffinées et préparées sur plaques adhésives SuperFrost® Plus (VWR International, UK). Les anticorps, utilisés spécifiquement pour cette technique, de souris anti-SP-A humain (mAb, 51891) et de chèvre anti-cathepsine S (pAb, 18822) proviennent de Abcam (Paris, France). Les anticorps anti-CK7 et anti-TTF1, qui permettent de marquer le cytoplasme et les noyaux cellulaires respectivement, proviennent de Dako (Trappe, France) ainsi que les solutions de lavage et de démasquage. Les anticorps primaires sont dilués dans la solution Dako Real™ Antibody Diluent.

Les coupes sont déparaffinées au xylène et lavées avec des bains d'éthanol puis à l'eau. Ensuite les antigènes sont démasqués par immersion des lames dans la solution Dako Target Retrieval (Tris/EDTA 1 mM, pH 9) et chauffage à 99°C pendant 40 minutes. Après refroidissement, les lames sont lavées à l'eau et en tampon PBS avec 0,2 % de Tween (PBST-20). Les peroxydases endogènes sont bloquées avec une solution de peroxyde d'hydrogène à 3% pendant 10 minutes puis les lames sont lavées au PBST-20. Pour finir les lames sont incubées avec l'anticorps primaire pendant 1 heure à température ambiante, lavées, et l'anticorps secondaire, Dako Envision-DualLink system HRP, est appliqué pendant 30 minutes. Avec l'anti-cathepsine S, l'anticorps secondaire est un anti-chèvre biotinylé (Dako). Après ajout de la solution de révélation, Dako Liquid DAB, coloration avec une solution d'hématoxyline, l'échantillon est déshydraté à l'alcool. Après ajout de la lame supérieure, les coupes sont ensuite observées au microscope optique (Nikon E600, grossissement de 20 à 1000 fois), et les images sont capturées avec une caméra Olympus DP70 et traitées avec le logiciel DP Controller Software (2002, Olympus Optical CO. LTD).

3.2.10. Auto-agrégation du SP-A

SP-A (3 µg) est incubé seul ou en présence de cathepsine S (100 nM) dans un tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 5,5, GSH 4 mM, Brij 35 0,01 % (Tampon A), pendant 1 heure à 37°C (volume final 20 µl). L'incubation est arrêtée avec le E-64 (5 µM). La cathepsine S est pré-

activée 5 minutes dans le tampon A avant ajout du SP-A, ou inactivée en présence de E-64 (5 μ M) pendant 15 minutes.

Le SP-A incubé est ensuite ajouté dans une cuve dite « essai » contenant du tampon HEPES 25 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 0,2 mM, GSSG (glutathion oxydé) 8 mM (tampon B) (volume final 600 μ l). En parallèle, une cuve dite « témoin » ne contient que le tampon. Après 10 minutes de stabilisation, le calcium (2,5 mM) est ajouté, puis à 40 minutes l'EDTA (5 mM), dans la cuve essai et la cuve témoin. L'auto-agrégation est suivie à 360 nm, à 37°C, pendant 50 minutes (spectrophotomètre Cary 100 scan Varian, Varian, Inc., Agilent Technologies, Massy, France) et analysée à l'aide du logiciel CARY WinUV kinetics (Agilent Technologies).

3.2.11. Préparation des vésicules de phospholipides et de Rc-LPS

Le Rc-LPS de la souche *E. coli* J5, le 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphocholine (DPPC) et le 1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-phosphoglycérol (DPPG) viennent de chez Sigma-Aldrich. Le mélange de DPPC/DPPG (7:3, m/m), ou le Rc-LPS, sont dissous dans une solution de chloroforme-méthanol (1:1, v/v). Après évaporation sous azote à 20°C, le mélange de DPPC/DPPG ou le Rc-LPS sont réhydratés en tampon HEPES 25 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 0,2 mM (3 mg/mL et 1,5 mg/ml respectivement), pendant 1 heure à 50°C (température de transition). Puis les préparations sont soumises à une sonication pour former les vésicules à l'aide d'un sonicateur Sonics VibraCell Ultrasonic Processor Model VC70T (Sonics & Materials, Newton, USA). On effectue dix phases de sonication de 30 secondes espacées de 15 secondes.

3.2.12. Agrégation des vésicules

SP-A (5 μ g) est incubé seul ou en présence de cathepsine S (100 nM) dans le tampon A, pendant 2 heures à 37°C (volume final 20 μ l). L'incubation est arrêtée par ajout de E-64 (5 μ M). La cathepsine S est pré-activée 5 minutes dans le tampon A avant ajout du SP-A, ou inactivée en présence de E-64 (5 μ M) pendant 15 minutes.

Le SP-A incubé est ensuite ajouté, après 10 minutes de stabilisation, dans la cuve essai contenant les vésicules de DPPC/DPPG (60 μ g/mL) en tampon B (volume final 600 μ l). Après 10 minutes de stabilisation, le calcium (2,5 mM) est ajouté, puis à 30 minutes l'EDTA

(5 mM). L'agrégation est suivie à 400 nm, à 37°C, pendant 40 minutes (spectrophotomètre Cary 100 scan Varian) et analysée à l'aide du logiciel CARY WinUV kinetics.

Pour l'agrégation des vésicules de Rc-LPS, 12 µg de SP-A est incubé avec 200 nM de cathepsine S pendant 4 heures et la concentration en vésicules est de 40 µg/ml. Un contrôle de compétition « vésicule vs mannane » est également réalisé en présence de SP-A et de mannane (10 mg/ml).

3.2.13. Cultures bactériennes

La souche *P. aeruginosa* (numéro ATCC 27853) est cultivée sur gélose Columbia agar (Fluka, Saint-Quentin Fallavier, France). Pour obtenir les bactéries en phase exponentielle, elles sont diluées au 1:10 à partir d'une culture sur la nuit dans un milieu TSB (Tryptic soy broth, Fluka) et cultivées pendant 3 heures à 37°C sous agitation. Les bactéries sont ensuite récupérées par centrifugation (2000 g, 10 minutes, Eppendorf Centrifuge 5810 R, France), lavées 3 fois et resuspendues en tampon PBS pH 7,4. La concentration est estimée par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance (Abs) à 595 nm suivant la table standard (Abs = 0,1 correspond à 8.10^7 bactéries/ml).

La souche *E. coli* J5 (numéro ATCC 43745) est cultivée sur gélose LB Lennox agar (Fluka, Saint-Quentin Fallavier, France). Pour obtenir les bactéries en phase exponentielle, elles sont diluées au 1:25 à partir d'une culture sur la nuit dans un milieu LB Broth (Fluka) et cultivées pendant 3 heures à 37°C sous agitation. Les bactéries sont ensuite récupérées par centrifugation (2000 g, 10 minutes, Eppendorf Centrifuge 5810 R, France), lavées 3 fois et resuspendues en tampon PBS pH 7,4, à une $DO_{620\text{ nm}}$ de 30 ($7,5.10^9$ bactéries/ml).

3.2.14. Agglutination d'*Escherichia coli*

SP-A (6 µg) est incubé seul ou en présence de cathepsine S (100 nM) en tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 5,5, DTT 2 mM, Brij 35 0,01% pendant 1 heure à 37°C. Le SP-A incubé est ensuite ajouté au tampon HEPES 25 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, KCl 5 mM, Calcium 2 mM contenant une préparation fraîche d'*E. coli* dans une cuve en quartz (2.5×10^8 bactéries/ml) (volume final 600 µl). L'agglutination bactérienne est déterminée en mesurant l'absorbance à 700 nm pendant 2 heures, à intervalle de 15 minutes, à 20°C (spectrophotomètre Hitachi U-1500, Hitachi High Technologies Corp., Tokyo, Japon). En contrôle, les expériences sont conduites avec les bactéries seules, la cathepsine S seule ou pré-

incubée avec le E-64 (100 μ M). En parallèle, l'agglutination est réalisée en tube avec 30 μ g de SP-A, les concentrations en cathepsine S et en bactéries sont inchangées, dans un volume final de 3 ml.

3.2.15. Agglutination de *Pseudomonas aeruginosa*

SP-A (3 μ g) est incubé seul ou en présence de cathepsine S (100 nM) en tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 5,5, DTT 2 mM, Brij 35 0,01% pendant 1 heure à 37°C. De manière similaire, l'incubation est réalisée également en tampon Tris-HCL 50 mM, pH 7,5, DTT 2 mM, Brij 35 0,01% pendant 2 heures. Le SP-A incubé est ensuite ajouté à une préparation fraîche de *P. aeruginosa* ($3 \cdot 10^7$ bactéries/ml) avec ou sans calcium dans un volume total de 200 μ l (plaque 96 puits, Maxisorp Nunc Immunoplate, Nunc A/S, Danemark). L'agglutination bactérienne est déterminée en mesurant l'absorbance à 570 nm pendant 3 heures, à intervalle de 5 minutes, à 20°C (spectrophotomètre Thermomax microplate, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, Etats Unis) et analysée avec le logiciel SOFTMAX PRO. En contrôle, les expériences sont conduites avec les bactéries seules, la cathepsine S seule ou pré-incubée avec le E-64 (100 μ M). En parallèle, la réaction est visualisée par coloration des bactéries avec du 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) dihydrochloride selon la méthode du fournisseur (Sigma-Aldrich) et observée au microscope à fluorescence.

3.2.16. Interaction du SP-A avec le mannane

SP-A (3 μ g) est incubé seul ou en présence de cathepsine S (100 nM) en tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 5,5, DTT 2 mM, Brij 35 0,01% pendant 1 heure à 37°C. De manière similaire, l'incubation est réalisée également en tampon Tris-HCL 50 mM, pH 7,5, DTT 2 mM, Brij 35 0,01%. En contrôle, les expériences sont conduites en pré-incubant la cathepsine S avec le E-64 (10 μ M). Le SP-A incubé est ensuite ajouté dans des puits où le mannane a été préalablement fixé (plaque 96 puits, Maxisorp Nunc Immunoplate, Nunc A/S, Danemark). La fixation du SP-A au mannane est ensuite révélée par l'ajout de l'anticorps anti-SP-A suivi de l'anticorps secondaire, du substrat TMB, et mesure colorimétrique à 450 nm au spectrophotomètre. Les résultats sont présentés sous forme d'absorbance relative (SP-A seul correspondant à 1), médiane +/- valeurs extrêmes et la significativité, $p < 0,05$, sont déterminées à l'aide du test d'analyse de variance de Friedman.

3.3. Résultats et discussion

3.3.1. Dégradation du SP-A : Implication des cathepsines à cystéine

Dans les surnageants d'expectoration, nous ne détectons pas par Western Blot de formes intactes du SP-A, que ce soit la forme dimérique (≈ 65 kDa) ou monomérique (≈ 34 kDa) (Figure 23). Cette observation est corrélée avec le déficit observé chez les patients CF dans les études précédentes (Griese *et al.*, 2004; Noah *et al.*, 2003). Par contre, nous observons une bande intermédiaire principale d'environ 45 kDa qui pourrait correspondre à un fragment protéolytique généré par des protéases. En effet, un fragment similaire est observé après hydrolyse du SP-A par la protéase IV de *P. aeruginosa* ou les protéases à sérine du neutrophile (Griese *et al.*, 2001; Rubio *et al.*, 2004).

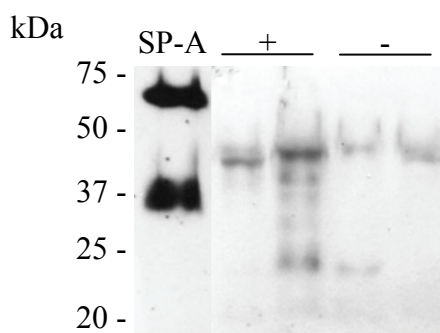


Figure 23 : SP-A dans les surnageants d'expectation CF

Le SP-A présent dans les surnageants d'expectation de patients CF colonisés par *P. aeruginosa* (+) ou non (-) est révélé par Western Blot (30 μ g de protéines, SDS-PAGE 15 % en conditions réductrices). Témoin SP-A (150 ng) : forme dimérique à 64 kDa et forme monomérique à 34 kDa.

L'implication des protéases de ce pathogène ainsi que celles sécrétées par les neutrophiles dans la dégradation du SP-A chez les patients CF est bien documentée mais d'autres protéases pourraient également être impliquées. En effet, la présence de ce fragment protéolytique de 45 kDa chez des patients non infectés par *P. aeruginosa* supporte cette hypothèse, et a déjà été mise en évidence dans une autre étude (Mariencheck *et al.*, 2003) (Figure 23). En outre, une étude sur les allergènes de Dermatophagoïdes, Der p1 et Der f1, qui sont des protéases à cystéine, montre qu'ils sont également capables de dégrader le SP-A (Deb *et al.*, 2007). Ainsi les cathepsines à cystéine humaines pourraient participer à l'altération du SP-A observée.

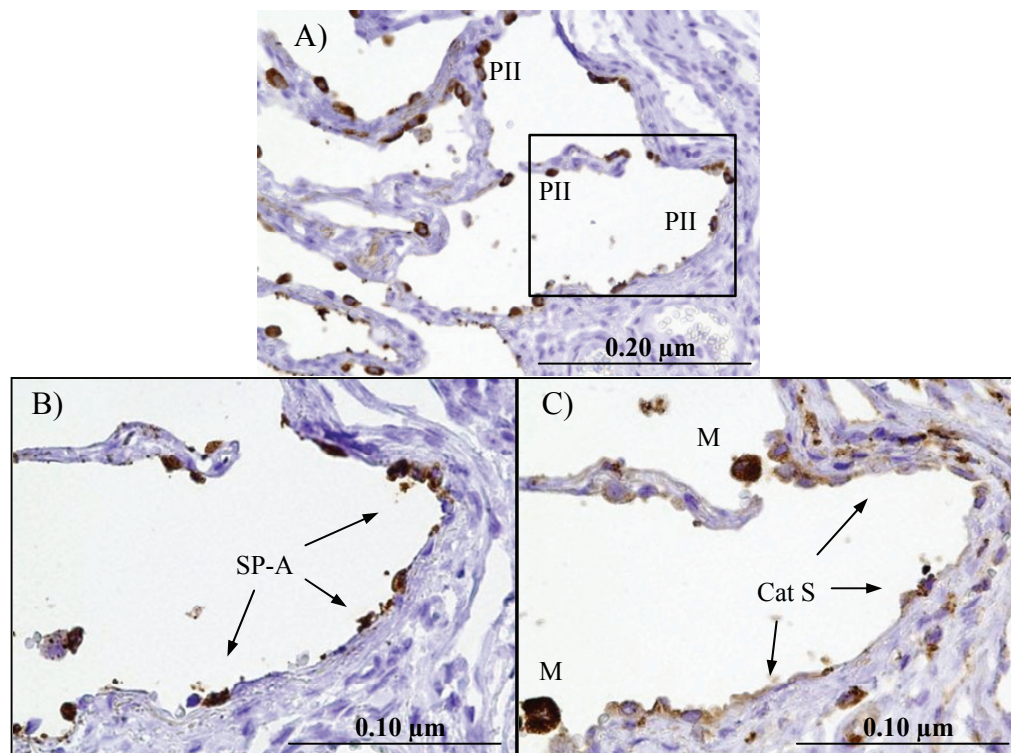


Figure 24 : Immunolocalisation du SP-A et de la cathepsine S au niveau des alvéoles pulmonaires humaines

Analyse par immunohistochimie de coupes sériees d'épithélium alvéolaire bronchique d'un patient sain. A) Pneumocytes de type II (PII) (grossissement x 200). Immunomarquage du SP-A (B) et de la cathepsine S (C) correspondant à la zone encadrée en A (grossissement x 400). M : macrophage.

Nous avons montré précédemment que les cathepsines B, H, K, L et S sont actives et sous-régulées par leurs inhibiteurs circulant chez les patients CF (Naudin *et al.*, 2011). De plus, il n'y a pas de corrélation entre les cathepsines et l'état infectieux des patients. Par conséquent, afin de vérifier la potentielle implication des cathepsines dans la dégradation du SP-A *in vivo*, nous avons tout d'abord examiné par immunohistochimie la localisation de celui-ci avec la cathepsine S, cette cathepsine étant un bon candidat compte tenu de son fort potentiel protéolytique à pH neutre (Hou *et al.*, 2003) (Figure 24).

Le SP-A est sécrété par les pneumocytes de type II, constituant l'épithélium alvéolaire avec les pneumocytes de type I (Figure 24 A). Au niveau de l'espace alvéolaire, SP-A forme des tubules de myéline avec SP-B et les lipides du surfactant, qui représentent un intermédiaire au film de surface, mais il est également capable de se libérer pour interagir avec ses autres ligands (Suzuki *et al.*, 1989; Wright, 2005). La cathepsine S quant à elle est sécrétée par les macrophages dans le milieu extracellulaire (Punturieri *et al.*, 2000). Avec cette analyse, nous observons la présence du SP-A au niveau de l'espace alvéolaire, à la surface de l'épithélium (Figure 24 B). De la même manière, la cathepsine S est également présente au niveau de l'épithélium alvéolaire (Figure 24 C). En outre, nous notons la présence de cellules dans l'espace alvéolaire qui sont très vraisemblablement des macrophages. Nous avons donc colocalisation au niveau de l'épithélium alvéolaire du SP-A et de la cathepsine S. Cette observation suggère que la cathepsine S pourrait participer à la dégradation du SP-A observée dans les expectorations. Par conséquent, nous avons poursuivi notre investigation en étudiant la capacité des cathepsines à dégrader le SP-A (Figure 25).

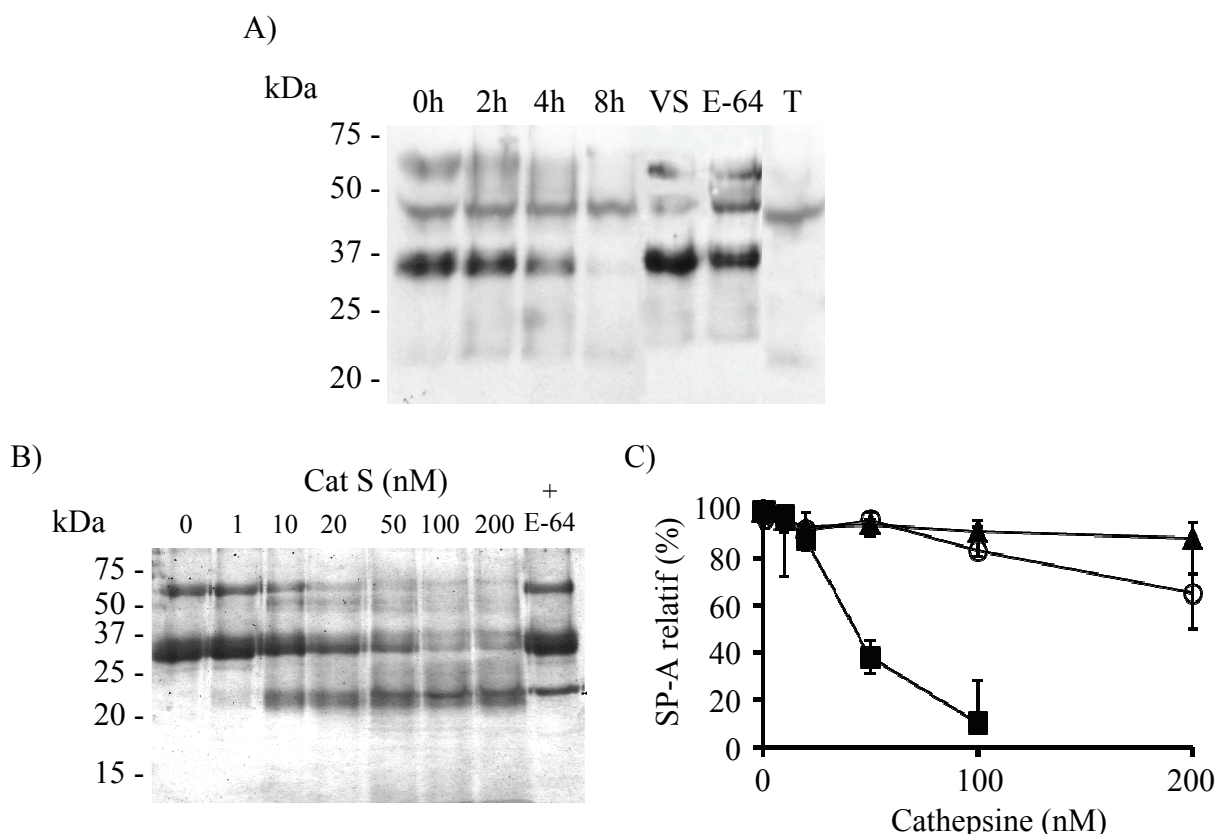


Figure 25 : Dégradation du SP-A par la cathepsine S

A) Le SP-A exogène (150 ng), incubé avec les surnageants d'expectoration de patient CF de 0 à 8 heures, est révélé par Western Blot avec l'anticorps anti-SP-A. Contrôle : pré-incubation en présence des inhibiteurs spécifiques des cathepsines (10 μ M): VS (Mu-Leu-Hph-VSPH) et E-64. T : surnageant seul. B) Le SP-A (3 μ g) est incubé avec des concentrations croissantes (0 à 200 nM) en cathepsine S pendant 10 min. Les produits d'hydrolyse ont été révélés par SDS-PAGE 15 % en conditions réductrices et colorés au bleu de Coomassie. C) La quantité de SP-A résiduelle en présence de la cathepsine S (■) a été mesurée par densitométrie et comparée avec les résultats obtenus avec les cathepsines K (○) et L (▲) (n=2). Les expériences ont été menées en tampon acétate de sodium 0,1 M, pH 5,5, DTT 4 mM, Brij 35 0,01 % à 37°C.

L'incubation de SP-A exogène avec les surnageants CF révèle en effet une dégradation dépendante des cathepsines, prévenue par l'utilisation de leur inhibiteur spécifique, le E-64 (Figure 25 A). Les cathepsines endogènes sont donc capables d'hydrolyser le SP-A. Il semblerait que la cathepsine S soit la principale enzyme responsable de cette hydrolyse étant donné le profil similaire obtenu avec l'inhibiteur de la cathepsine S, Mu-Leu-Hph-VSPH, et le E-64. En effet, la cathepsine S hydrolyse fortement le SP-A *in vitro* (Figure 25 B). Il est à noter qu'un profil similaire d'hydrolyse du SP-A exogène a été obtenu à pH 7,4 où seule la cathepsine S possède une activité protéolytique compte tenu de sa stabilité à pH neutre (Hou

et al., 2003). Cependant, même si l'inhibiteur de la cathepsine S, Mu-Leu-Hph-VSP_h, utilisé en parallèle du E-64 pour l'hydrolyse du SP-A exogène, est sélectif de cette cathepsine, il n'est pas totalement exclu qu'il y ait une inhibition résiduelle des cathepsines K et L présentes dans le milieu (Brömme *et al.*, 1996a). Par conséquent, des essais *in vitro* avec les enzymes purifiées ont été répétés (Figure 25 C). Seule la cathepsine S hydrolyse fortement le SP-A, tandis que la dégradation reste faible avec les cathepsines K et L. Par ailleurs, les cathepsines B, C et H n'hydrolysent pas le SP-A (résultats non montrés). Ainsi, la cathepsine S présente effectivement le plus fort potentiel protéolytique vis-à-vis de SP-A, générant des fragments intermédiaires entre 40 et 60 kDa, dont deux fragments principaux, et un fragment de 22 kDa environ (Figure 25 B).

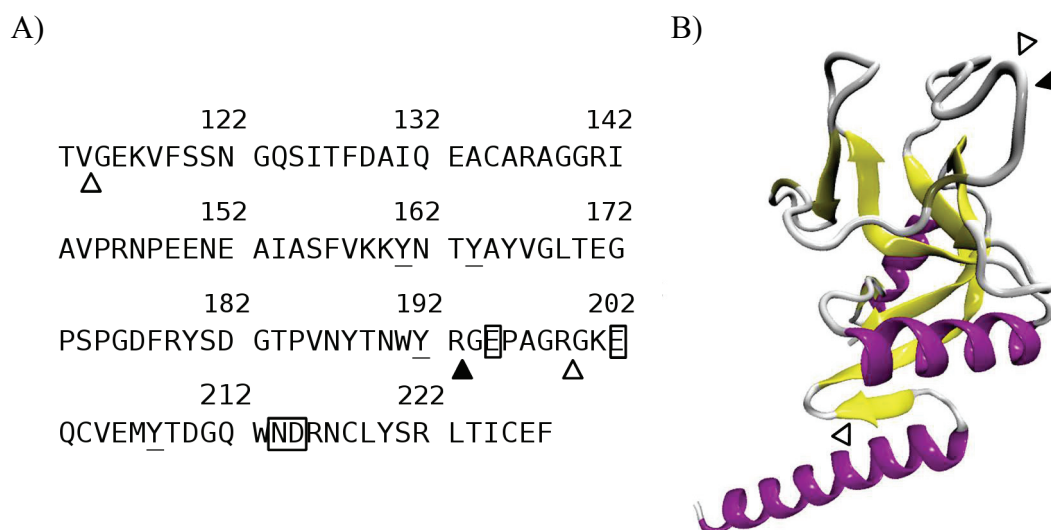


Figure 26 : Clivage du SP-A par la cathepsine S

A) Identification des sites de clivage par séquençage N-terminal (méthode d'Edman). Résidus encadrés : acides aminés impliqués dans la fixation du calcium et des sucres. Résidus tyrosine soulignés : potentiellement impliqués dans la fixation des lipides. B) Représentation du domaine CRD du SP-A et des sites de coupure de la cathepsine S.

▲ : site principal de clivage ; Δ : sites secondaires de clivage.

Afin d'identifier les sites de clivage correspondant aux deux fragments intermédiaires, nous avons réalisé un séquençage N-terminal et 3 sites ont été identifiés, localisés dans le domaine de reconnaissance des sucres, le domaine CRD (Figure 26 A). Un premier site, Val114-Gly115, est situé à l'extrémité N-terminale du domaine CRD, adjacent à la région charnière entre le domaine CRD et le domaine de coude (*Neck*) (Figure 26 B). Compte tenu de la localisation de ce clivage, on peut supposer qu'il entraîne déjà l'inactivation des propriétés du SP-A associées au domaine CRD. Les deux autres sites de clivage, dont le principal est

Arg193-Gly194, sont localisés à proximité des résidus critiques impliqués dans la reconnaissance des sucres. Cette région, du résidu Ser181 au résidu Gln203, forme une grande boucle à la surface du domaine CRD (Shang *et al.*, 2011). Elle est constituée des deux résidus, Glu195 et Glu202 (Arg197 chez le rat), qui participent à la liaison de coordination avec l'ion calcium en compagnie des résidus Asn214 et Asp215 (Head *et al.*, 2003). De plus, les études de mutagenèse du résidu Glu202 montrent que ce résidu est d'une part impliqué dans la fixation du calcium mais est critique également pour la fixation des phospholipides et des carbohydrates (McCormack *et al.*, 1997b, 1997c). Ainsi, les deux clivages, Arg193-Gly194 et Arg199-Gly200, ont lieu dans la région conservée impliquée dans la liaison au calcium et aux ligands, ce qui suggère qu'ils entraînent la perte des fonctionnalités du SP-A. Par conséquent, ces clivages pourraient inhiber les propriétés biologiques de SP-A avec un effet sur la structure des tubules de myéline, dépendant de sa liaison aux phospholipides, et sur son rôle dans l'immunité innée, dépendant en particulier de la fixation des carbohydrates et du lipide A à la surface des pathogènes (Van Iwaarden *et al.*, 1994; Kalina *et al.*, 1995). Cette hypothèse est supportée par les études de l'implication des protéases à sérine du neutrophile dans la dégradation de la deuxième collectine du surfactant, SP-D, qui montrent que le clivage dans cette région par ces protéases inactive le SP-D et en particulier ses propriétés d'agglutination vis-à-vis de *P. aeruginosa* ou bien encore de *Klebsiella pneumoniae* (Griese *et al.*, 2003; Hirche *et al.*, 2004).

3.3.2. Régulation des propriétés d'agrégation du SP-A

Le SP-A a la capacité de s'auto-agréger et de se lier à de nombreux ligands sous la dépendance du domaine CRD (Casals, 2001; McCormack *et al.*, 1997b). Les propriétés d'agrégation du SP-A peuvent être étudiées par spectrophotométrie à l'aide de vésicules de phospholipides (Ross *et al.*, 1991). De nombreux travaux ont été menés pour caractériser les fonctions du SP-A à l'aide de ces techniques. Le SP-A est en particulier capable de fixer et d'agglutiner des vésicules de phospholipides contenant du DPPC (Casals *et al.*, 1993; Ruano *et al.*, 1998). Nous avons donc étudié l'influence de la dégradation du SP-A par la cathepsine S sur ses capacités d'auto-agrégation et d'agrégation de vésicules de DPPC/DPPG.

L'auto-agrégation du SP-A et l'agrégation des vésicules sont suivies après ajout du calcium (Ruano *et al.*, 1996). Notre étude révèle qu'après incubation du SP-A avec la cathepsine S, celui-ci n'est plus capable de s'auto-agréger mais également d'agréger les vésicules de phospholipides (Figure 27 A-B). Nous avons également étudié l'agrégation de vésicules de

LPS rugueux (Rough), constituant de la membrane des bactéries à Gram négatif, ligands connus du SP-A (Van Iwaarden *et al.*, 1994). De la même manière, nous n'observons plus l'agrégation des vésicules de Rc-LPS lorsque SP-A est incubé avec la cathepsine S (Figure 27 C). En effet, nous obtenons un signal d'absorbance similaire à l'auto-agrégation des vésicules de LPS, phénomène connu en présence de calcium (Sánchez-Barbero *et al.*, 2005). En outre, l'inactivation de la cathepsine S avec le E-64 permet de récupérer l'agrégation. De plus, en présence de mannane, l'absorbance est similaire à celle obtenue en absence de SP-A ou avec le SP-A dégradé par la cathepsine S.

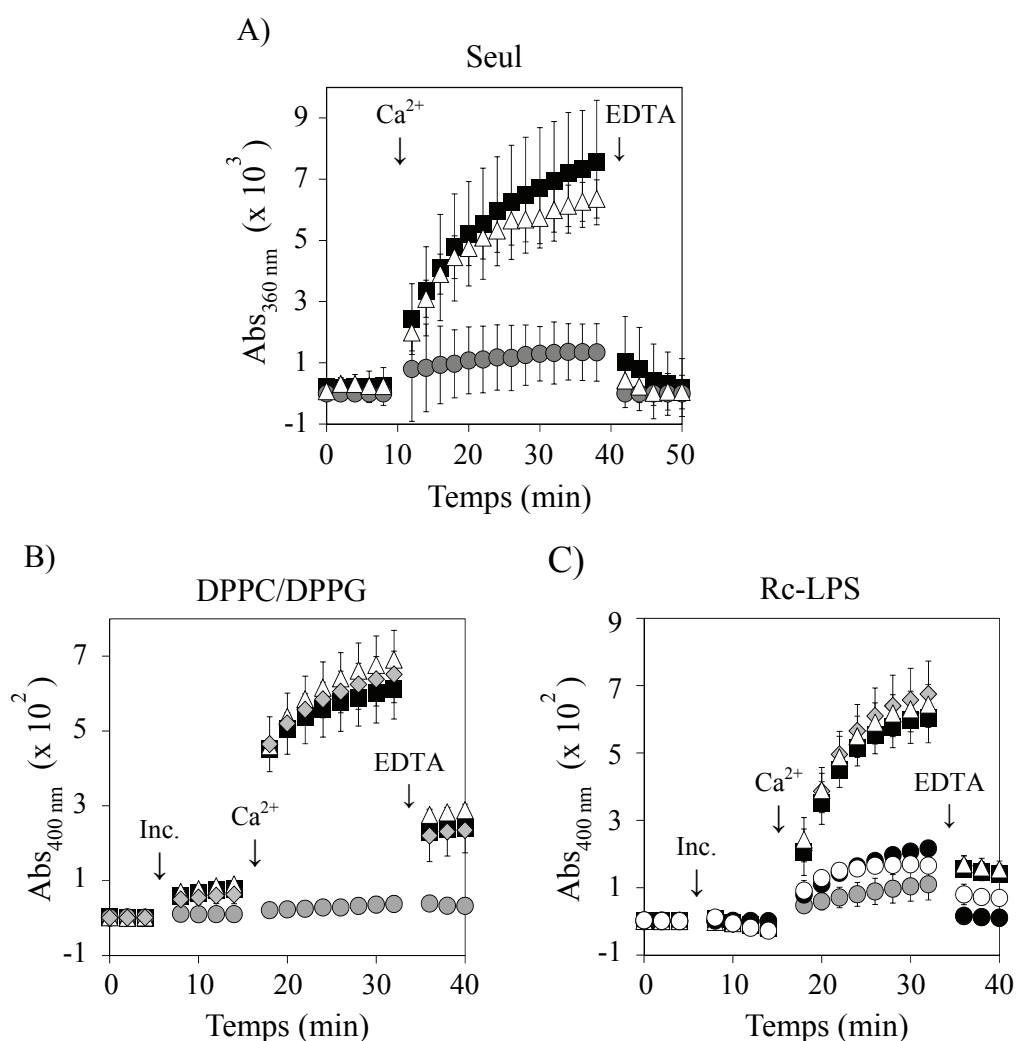


Figure 27 : Auto-agrégation du SP-A et agrégation des vésicules de phospholipides et de Rc-LPS

A) Auto-agrégation du SP-A en présence de calcium. B) Agrégation des vésicules de DPPC/DPPG (rapport : 7/3, w/w). C) Agrégation des vésicules de Rc-LPS. (n = 3) Les expériences ont été menées en tampon HEPES 25 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, GSSG 8 mM, à 37°C. Après stabilisation du signal, le SP-A incubé (Inc.) a été ajouté.

■ : SP-A seul ; ● : SP-A + Cat S ; Δ : SPA + (Cat S + E-64) ; ◆ : SP-A + Cat S inactivée par chauffage ; ● : LPS seul ; ○ : (SP-A + Mannane) + LPS.

Ainsi, l'augmentation de l'absorbance avec le SP-A est bien due à l'agglutination des vésicules via le domaine CRD. En effet, le mannane rentre en compétition avec les vésicules de Rc-LPS, vis-à-vis du SP-A. Par ailleurs, l'absorbance étant similaire à celle observée avec le SP-A dégradé par la cathepsine S, cela ne fait que corroborer que les clivages ont lieu dans le domaine CRD du SP-A. Il a été montré précédemment qu'il y a une corrélation entre ces trois phénomènes d'agrégation, qui seraient dépendant de la structure supra-trimérique du SP-A (Sánchez-Barbero *et al.*, 2005). Ainsi, la perte des capacités d'agrégation du SP-A une fois dégradé par la cathepsine S suggère que l'hydrolyse du SP-A inhibe sa capacité à former des structures supra-trimériques. De plus, les sites de clivage ayant lieu dans le domaine CRD, et en particulier dans la région critique impliquée dans la fixation du calcium, des sucres et des lipides, le SP-A dégradé ne possède certainement plus une structure lui permettant de lier ces ligands comme le démontre la perte de l'agrégation des vésicules. En conséquence, les clivages dans le domaine CRD pourrait entraîner la perte des propriétés antibactériennes du SP-A mais également altérer son implication dans la structure et le métabolisme du surfactant pulmonaire.

3.3.3. Régulation des propriétés antibactériennes du SP-A

Pour déterminer l'impact de la dégradation du SP-A par la cathepsine S sur ses propriétés antibactériennes, nous avons examiné les capacités du SP-A à agglutiner les bactéries ainsi qu'à fixer le mannane, ces deux propriétés étant bien caractérisées et impliquant le domaine CRD (Weis *et al.*, 1998). Les deux souches utilisées pour l'agglutination bactérienne sont *E. coli* (souche J5), utilisée couramment comme modèle bactérien possédant un Rc-LPS, et *P. aeruginosa*, pathogène majeur colonisant les poumons des patients CF (May *et al.*, 1991). Dans un premier temps, l'agglutination de *P. aeruginosa* est suivie par mesure de l'absorbance (570 nm) au cours du temps, ainsi qu'en point final en microscopie optique et en fluorescence (coloration au DAPI). Une différence d'agglutination lorsque que le SP-A a été pré-incubé avec la cathepsine S est observée dès 40 minutes d'incubation et se poursuit jusqu'à 200 minutes (Figure 28 A). L'inhibition de l'agglutination observée est bien due à l'activité protéolytique de la cathepsine S comme le montre l'utilisation du E-64, avec lequel une agglutination similaire au SP-A seul est obtenue. En microscopie, nous observons une diminution voire l'absence d'agglutinats lorsque SP-A est incubé avec la cathepsine S et celle-ci est prévenue par le E-64 (Figure 28 B). La présence de E-64 ou de cathepsine S seule avec les bactéries n'affecte pas l'agglutination bactérienne (données non montrées). Nous

avons obtenu des résultats similaires en absence ou en présence de calcium, seul ce dernier est montré. La présence d'agglutination en absence de calcium est expliquée par des interactions avec les bactéries indépendantes des propriétés de type lectine, mais impliquant tout de même le domaine CRD. En effet, des études précédentes montrent que le calcium augmente les propriétés d'agrégation et d'agglutination mais qu'en son absence la fixation aux lipides ainsi qu'au LPS de type rugueux est possible (Van Iwaarden *et al.*, 1994).

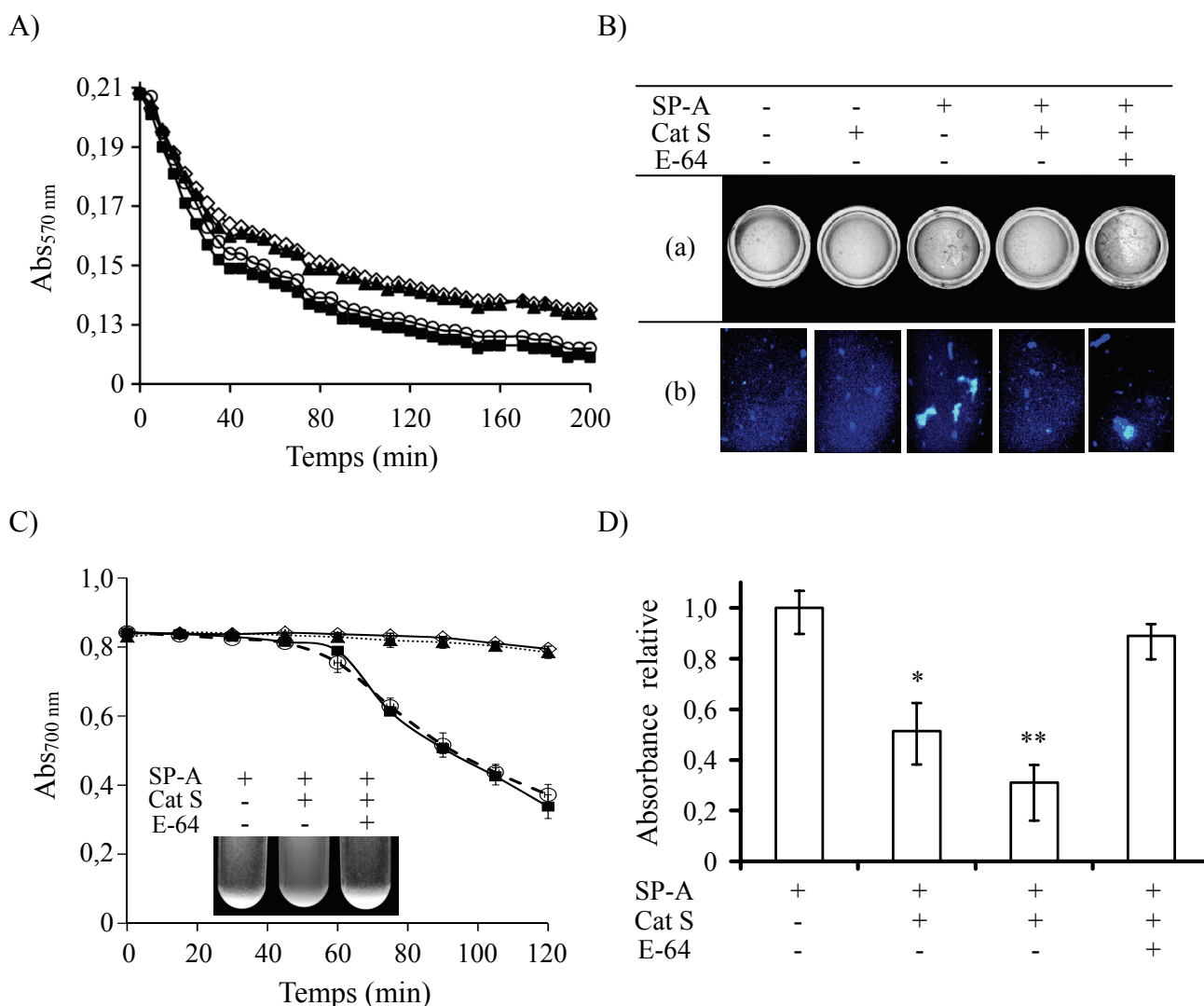


Figure 28 : Agglutination bactérienne et fixation du mannane

Agglutination de *P. aeruginosa* analysée par densitométrie (A) ou en microscopie (B) optique (a) et à fluorescence (bleu : coloration au Dapi) (b). C) Agglutination de *E. coli* analysée par densitométrie et en point final en tube. D) Analyse de fixation du mannane par le SPA. Significativité $p < 0,05$ vis-à-vis du témoin seul pH 5,5 (*) et pH 7,4 (**). (n = 2)

◇ : bactéries seules ; ○ : + SP-A ; ▲ : + SP-A + Cat S ; ■ : + SP-A + (CatS + E-64).

De plus, les études cristallographiques des trimères de « Neck-CRD » suggèrent que le SP-A pourrait interagir avec les lipides, en particulier le DPPC, et le LPS rugueux via des résidus tyrosine (Tyr161, Tyr164, Tyr208, Tyr192) n'impliquant pas le calcium (Head *et al.*, 2003). Ces quatre résidus formeraient une poche hydrophobe adéquate pour fixer ces ligands. Des résidus du côté C-terminal, comme Arg216 ou Arg222, seraient également susceptibles de les lier à l'aide de leur chaîne latérale basique. Ainsi, en présence de calcium, le domaine CRD du SP-A adopterait une conformation plus propice à la fixation des ligands (Ruano *et al.*, 2000).

Dans un deuxième temps, nous avons suivi l'agglutination d'*E. coli* J5 par spectrofluorométrie au cours du temps et en point final en tube. SP-A a été incubé seul ou avec la cathepsine S pendant 1 heure à 37°C avant d'examiner sa capacité à agglutiner *E. coli*. L'agglutination bactérienne est mesurée par diminution de l'absorbance (Abs 700 nm) due à la précipitation des agrégats. Tandis que le SP-A intact agglutine *E. coli* comme le montre la diminution de l'absorbance à partir d'une heure, après incubation avec la cathepsine S, il n'y a plus d'agglutination avec une absorbance similaire aux bactéries avec du calcium (Figure 28 C). De plus, lorsque la cathepsine S est inactivée avec du E-64, l'absorbance est similaire au SP-A seul. L'expérience en tube permet de visualiser clairement ce phénomène. La présence de E-64 ou de cathepsine S seule avec les bactéries n'affecte pas l'agglutination bactérienne (données non montrées). Ainsi, de manière similaire aux essais avec *P. aeruginosa*, le SP-A dégradé n'est plus capable d'agglutiner *E. coli* et cette inhibition est due à l'activité protéolytique de la cathepsine S vis-à-vis de SP-A.

Pour finir, avec les mêmes conditions de clivage que pour les essais d'agglutination bactérienne, le traitement du SP-A par la cathepsine S à pH 5,5 et pH 7,4 diminue sa fixation au mannane de 50 % et de 70 %, respectivement, et cette fixation est rétablie lorsque l'enzyme est pré-incubée avec le E-64 (Figure 28 D). Cette expérience confirme que la cathepsine S inactive le SP-A, et ceci par clivage protéolytique dans son domaine CRD.

3.4. Conclusion

La protéine du surfactant SP-A est la collectine majeure du surfactant pulmonaire. SP-A joue un rôle important dans la défense immunitaire innée des poumons incluant l'agglutination, l'opsonisation et l'augmentation de la clairance des pathogènes inhalés (McCormack & Whitsett, 2002). Le SP-A participe également à l'homéostasie et à la structure du surfactant comme le montrent les études de mutagenèse dirigée chez les souris. Ainsi, il est capable d'interagir avec les lipides du surfactant, en particulier le DPPC, et ceux à la surface des pathogènes. Ces propriétés sont dépendantes principalement de son domaine lectine CRD par lequel il fixe à la fois les glycoconjugués, faisant appel à ses capacités de lectine dépendantes du calcium, et les lipides. Cependant, SP-A est altéré, que ce soit quantitativement ou qualitativement, chez les patients atteints de mucoviscidose (Rubio *et al.*, 2004). Parmi les causes de cet état de fait, l'activité protéolytique d'enzymes a été soupçonnée, et a permis de déterminer l'implication des protéases de *Pseudomonas aeruginosa* ainsi que les protéases à sérine du neutrophile humain, mais l'action d'autres protéases reste à déterminer. Les cathepsines à cystéine sont présentes dans l'espace alvéolaire et sous-régulées par leurs inhibiteurs spécifiques dans de nombreuses pathologies inflammatoires pulmonaires dont la mucoviscidose. De plus, elles sont capables d'inactiver des protéines et des peptides antimicrobiens, ce qui a pour conséquence directe l'altération de la défense immunitaire pulmonaire. Dans cette étude, nous nous sommes donc intéressés aux capacités des cathepsines à cystéine à réguler l'activité du SP-A, en étudiant sa dégradation par ces protéases et l'impact sur son activité, avec en particulier les conséquences sur ses propriétés antibactériennes.

Après avoir observé que le SP-A est fortement dégradé dans les surnageants d'expectoration, l'incubation de SP-A exogène avec ceux-ci nous a permis de déterminer l'implication potentielle des cathepsines, en particulier de la cathepsine S, dans la dégradation du SP-A. En effet, l'hydrolyse *in vitro* avec chacune des cathepsines a révélé que la cathepsine S a le plus fort potentiel hydrolytique vis-à-vis de SP-A. Nous avons ensuite identifié les sites de clivage qui ont lieu dans le domaine globulaire CRD du SP-A, dans la région conservée contenant les résidus critique à la fixation du calcium, des lipides et des sucres. Afin d'appuyer notre hypothèse de l'implication de cette cathepsine dans la dégradation du SP-A, nous avons examiné leur localisation au niveau des alvéoles pulmonaires. En effet, on note par immunohistochimie une colocalisation au niveau de la bordure épithéliale du SP-A et de la

cathepsine S. Par la suite, l'impact de l'hydrolyse sur les propriétés d'agrégation a été étudié. Après incubation du SP-A avec la cathepsine S, celui-ci n'est plus capable de s'auto-agréger ou d'agréger des vésicules de phospholipides et de LPS de type rugueux. De la même manière, le SP-A dégradé perd ses capacités d'agglutiner les bactéries dont *P. aeruginosa*, qui est le pathogène majeur des patients CF. Pour finir, l'étude de l'influence du calcium et du pH, qui génèrent des changements de conformation du SP-A, révèle que la fixation du calcium diminue son hydrolyse mais par contre celle-ci est plus rapide à pH 7,4 qu'à pH 5,5 malgré une activité protéolytique plus faible.

Les cathepsines à cystéine pourraient donc participer à la dégradation du SP-A observée chez les patients CF. Cette dégradation a lieu dans le domaine fonctionnel CRD du SP-A, entraînant la perte de ses propriétés antibactériennes et d'agrégation des lipides, ce dernier point étant en lien avec l'homéostasie et la structure du surfactant. Ainsi, les cathepsines participeraient au défaut de l'immunité innée, à l'exacerbation de l'inflammation et bien sûr à l'augmentation de l'état infectieux des patients CF.

Conclusion générale

La mucoviscidose est une pathologie héréditaire qui, au niveau pulmonaire, se caractérise par une inflammation chronique associée à des infections, en particulier bactériennes. Parmi les médiateurs principaux de l'évolution de cette maladie, on trouve avec les molécules oxydantes les protéases, qui participent à la dégradation des constituants de la matrice extracellulaire. Outre l'implication des protéases et des molécules oxydantes dans les phénomènes inflammatoires, un défaut du système immunitaire inné semble également participer à l'exacerbation de l'inflammation et la persistance des pathogènes infectieux. Dans ce contexte, le rôle des cathepsines à cystéine n'est pas bien établi, bien qu'elles soient actives dans l'environnement extracellulaire et capables de réguler des acteurs de l'inflammation et de l'immunité innée.

Parmi les cathepsines présentes au niveau de l'épithélium pulmonaire, la cathepsine B est la cathepsine majoritaire retrouvée lors de pathologies inflammatoires aiguës ou chroniques, à côté des cathepsines H, K, L et S. De plus, les cathepsines sont sous-régulées par leurs inhibiteurs endogènes, dont les kininogènes qui sont retrouvés dégradés. Outre sa forte concentration, la cathepsine B présente un intérêt particulier dû à la présence d'une boucle d'occlusion, qui limite l'accès à son site actif, et qui lui permet d'avoir des activités enzymatiques sensiblement différentes des autres cathepsines. D'autre part, elle est faiblement inhibée par les kininogènes. Lors de cette étude, nous avons montré que la cathepsine B participe à la dégradation des kininogènes. La dégradation a lieu dans les régions inter-domaines, en amont des domaines inhibiteurs D2 et D3, mais également à l'intérieur du domaine D3 à proximité d'une des régions critiques au mécanisme d'inhibition. Ainsi la cathepsine B serait impliquée dans le déséquilibre de la balance cathepsines/inhibiteurs. Par la suite, nous avons examiné le rôle de la boucle d'occlusion dans le défaut d'inhibition par les kininogènes. Nous avons déterminé, à l'aide de cathepsines B mutantes au niveau des résidus critiques pour le positionnement de la boucle (His110 et His111), qu'en présence d'une boucle d'occlusion ouverte, dépourvue du pont salin stabilisé normalement par le résidu His110, on retrouve une inhibition élevée par les kininogènes, similaire aux autres cathepsines, et l'absence de protéolyse. Ainsi, la capacité de la cathepsine B à dégrader les kininogènes et le défaut d'inhibition sont clairement dus à la présence de cette boucle d'occlusion limitant l'accès au site actif.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la balance cathepsines/inhibiteurs chez les patients atteints de mucoviscidose afin d'examiner leur potentielle implication dans la physiopathologie de la maladie. En effet, les cathepsines B, H, K, L et S sont présentes et en

concentration deux fois supérieure à leurs inhibiteurs. Comme dans les autres pathologies inflammatoires étudiées, la cathepsine B est présente en majorité représentant la moitié de l'activité cathepsine. Cependant, nous n'observons pas de différences significatives dans les concentrations en cathepsines, individuelles ou totales, entre les patients colonisés ou non par *Pseudomonas aeruginosa*, pathogène majeur des patients CF. Contrairement à l'élastase humaine, les cathepsines ne sont donc pas des marqueurs de colonisation par ce pathogène. Ainsi, par leur activité protéolytique sous-régulée, les cathepsines à cystéine sont susceptibles d'être impliquées dans les phénomènes inflammatoires et infectieux observés chez les patients atteints de mucoviscidose.

Parmi les molécules impliquées dans l'immunité innée au niveau pulmonaire, la protéine du surfactant SP-A joue un rôle très important en participant à la clairance des bactéries et en modulant les cellules de l'immunité. Ses propriétés anti-infectieuses, ainsi que sa participation à la structure du surfactant, sont dépendantes de son domaine fonctionnel de type lectine, le domaine CRD. Cependant, SP-A est retrouvé diminué chez les patients CF avec la présence de fragments protéolytiques, ce qui contribue très certainement à l'altération de la défense innée. Dans notre étude, nous avons examiné l'implication potentielle des cathepsines à cystéine dans ce défaut en SP-A et de manière plus globale dans celui de l'immunité via cette collectine. Les cathepsines, en particulier la cathepsine S, sont en effet capables de dégrader le SP-A, qu'elles soient purifiées ou endogènes dans les expectorations CF. La détermination des sites de clivage, après hydrolyse par la cathepsine S, a révélé qu'elle clive le SP-A dans son domaine CRD. En particulier, les clivages sont situés dans la région constituée des résidus critiques à la fixation du calcium, des sucres et des lipides. Etant donné la localisation des clivages, nous avons ensuite étudié l'impact sur les propriétés du SP-A. En effet, le SP-A dégradé perd ses propriétés d'agrégation et d'agglutination bactérienne. Par conséquent, la cathepsine S est capable d'inactiver le SP-A, et les cathepsines participeraient donc au défaut de SP-A observé chez les patients CF.

En conclusion, ces travaux ont permis d'établir la présence d'un déséquilibre protéolytique en faveur des cathepsines dans la mucoviscidose, et que la cathepsine B favorise ce déséquilibre. Les cathepsines sont également impliquées dans le défaut de SP-A, s'ajoutant à la liste d'autres molécules antimicrobiennes inactivées par celles-ci. Ces données confirment le rôle émergent des cathepsines à cystéine dans les pathologies pulmonaires, et en particulier dans la mucoviscidose, avec un impact sur l'inflammation et l'état infectieux des patients. Ainsi, les

cathepsines représentent très certainement une cible thérapeutique non négligeable à côté des protéases à sérine.

Bibliographie

Abrahamson, M., Barrett, A. J., Salvesen, G. & Grubb, A. (1986). Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. *J Biol Chem* 261, 11282-11289.

Abrahamson, M., Ritonja, A., Brown, M. A., Grubb, A., Machleidt, W. & Barrett, A. J. (1987). Identification of the probable inhibitory reactive sites of the cysteine proteinase inhibitors human cystatin C and chicken cystatin. *J Biol Chem* 262, 9688-9694.

Accurso, F., Rowe, S. M., Durie, P., et al. (2008). Interim results of a phase IIa study of VX- 770 to evaluate safety, pharmacokinetics and biomarkers of CFTR activity in cystic fibrosis subjects with G551D. *Pediatr Pulmonol* 43, Abstract 267.

Adams, F. H., Towers, B., Osher, A. B., Ikegami, M., Fujiwara, T. & Nozaki, M. (1978). Effects of tracheal instillation of natural surfactant in premature lambs. I. Clinical and autopsy findings. *Pediatr Res* 12, 841-848.

Adkison, A. M., Raptis, S. Z., Kelley, D. G. & Pham, C. T. N. (2002). Dipeptidyl peptidase I activates neutrophil-derived serine proteases and regulates the development of acute experimental arthritis. *J Clin Invest* 109, 363-371.

Adler, F. R., Aurora, P., Barker, D. H., Barr, M. L., Blackwell, L. S., Bosma, O. H., Brown, S., Cox, D. R., Jensen, J. L., et coll. (2009). Lung transplantation for cystic fibrosis. *Proc Am Thorac Soc* 6, 619-633.

Al-Khunaizi, M., Luke, C. J., Askew, Y. S., Pak, S. C., Askew, D. J., Cataltepe, S., Miller, D., Mills, D. R., Tsu, C., et coll. (2002). The serpin SQN-5 is a dual mechanistic-class inhibitor of serine and cysteine proteinases. *Biochemistry* 41, 3189-3199.

Alcorn, J. F. & Wright, J. R. (2004). Degradation of pulmonary surfactant protein D by *Pseudomonas aeruginosa* elastase abrogates innate immune function. *J Biol Chem* 279, 30871-30879.

Alexander, B. D., Petzold, E. W., Reller, L. B., Palmer, S. M., Davis, R. D., Woods, C. W. & Lipuma, J. J. (2008). Survival after lung transplantation of cystic fibrosis patients infected with *Burkholderia cepacia* complex. *Am J Transplant* 8, 1025-1030.

Almeida, P. C., Nantes, I. L., Chagas, J. R., Rizzi, C. C., Faljoni-Alario, A., Carmona, E., Juliano, L., Nader, H. B. & Tersariol, I. L. (2001). Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. *J Biol Chem* 276, 944-951.

Anastasi, A., Brown, M. A., Kembhavi, A. A., Nicklin, M. J., Sayers, C. A., Sunter, D. C. & Barrett, A. J. (1983). Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases. Improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum. *Biochem J* 211, 129-138.

Anderson, M. P., Gregory, R. J., Thompson, S., Souza, D. W., Paul, S., Mulligan, R. C., Smith, A. E. & Welsh, M. J. (1991). Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253, 202-205.

Asagiri, M., Hirai, T., Kunigami, T., Kamano, S., Gober, H.-J., Okamoto, K., Nishikawa, K., Latz, E., Golenbock, D. T., et coll. (2008). Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. *Science* 319, 624-627.

- Ascenzi, P., Salvati, L., Bolognesi, M., Colasanti, M., Polticelli, F. & Venturini, G. (2001). Inhibition of cysteine protease activity by NO-donors. *Curr Protein Pept Sci* 2, 137-153.
- Ashbaugh, D. G., Bigelow, D. B., Petty, T. L. & Levine, B. E. (1967). Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2, 319-323.
- Avery, M. E. & Mead, J. (1959). Surface properties in relation to atelectasis and hyaline membrane disease. *AMA J Dis Child* 97, 517-523.
- Bailey, T. C., Maruscak, A. A., Petersen, A., White, S., Lewis, J. F. & Veldhuizen, R. A. W. (2006). Physiological effects of oxidized exogenous surfactant in vivo: effects of high tidal volume and surfactant protein A. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291, L703-709.
- Ballard, P. L., Noguee, L. M., Beers, M. F., Ballard, R. A., Planer, B. C., Polk, L., deMello, D. E., Moxley, M. A. & Longmore, W. J. (1995). Partial deficiency of surfactant protein B in an infant with chronic lung disease. *Pediatrics* 96, 1046-1052.
- Barclay, G. R. & Scott, B. B. (1987). Serological relationships between *Escherichia coli* and *Salmonella* smooth- and rough-mutant lipopolysaccharides as revealed by enzyme-linked immunosorbent assay for human immunoglobulin G antiendotoxin antibodies. *Infect Immun* 55, 2706-2714.
- Barrett, A. J. (1986). The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. *Biomed Biochim Acta* 45, 1363-1374.
- Barrett, A. J. (1992). Cellular proteolysis. An overview. *Ann N Y Acad Sci* 674, 1-15.
- Barrett, A. J. & Kirschke, H. (1981). Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. *Meth Enzymol* 80 Pt C, 535-561.
- Barrett, A. J., Kembhavi, A. A. & Hanada, K. (1981). E-64 [L-trans-epoxysuccinyl-leucyl-amido(4-guanidino)butane] and related epoxides as inhibitors of cysteine proteinases. *Acta Biol Med Ger* 40, 1513-1517.
- Barrett, A. J., Kembhavi, A. A., Brown, M. A., Kirschke, H., Knight, C. G., Tamai, M. & Hanada, K. (1982). L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem J* 201, 189-198.
- Barros, N. M. T., Tersariol, I. L. S., Oliva, M. L. V., Araújo, M. S., Sampaio, C. A. M., Juliano, L. & Motta, G. da. (2004). High molecular weight kininogen as substrate for cathepsin B. *Biol Chem* 385, 551-555.
- Beatty, A. L., Malloy, J. L. & Wright, J. R. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* degrades pulmonary surfactant and increases conversion in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32, 128-134.
- Beharka, A. A., Gaynor, C. D., Kang, B. K., Voelker, D. R., McCormack, F. X. & Schlesinger, L. S. (2002). Pulmonary surfactant protein A up-regulates activity of the mannose receptor, a pattern recognition receptor expressed on human macrophages. *J Immunol* 169, 3565-3573.
- Benne, C. A., Kraaijeveld, C. A., van Strijp, J. A., Brouwer, E., Harmsen, M., Verhoef, J., van Golde, L. M. & van Iwaarden, J. F. (1995). Interactions of surfactant protein A with influenza A viruses: binding and neutralization. *J Infect Dis* 171, 335-341.
- Berdowska, I. (2004). Cysteine proteases as disease markers. *Clin Chim Acta* 342, 41-69.

- Berti, P. J. & Storer, A. C. (1995). Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. *J Mol Biol* 246, 273-283.
- Bhoola, K. D., Figueroa, C. D. & Worthy, K. (1992). Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev* 44, 1-80.
- Birrer, P. (1993). Consequences of unbalanced protease in the lung: protease involvement in destruction and local defense mechanisms of the lung. *Agents Actions Suppl* 40, 3-12.
- Björk, I. & Ylinenjärvi, K. (1990). Interaction between chicken cystatin and the cysteine proteinases actinidin, chymopapain A, and ficin. *Biochemistry* 29, 1770-1776.
- Blott, E. J. & Griffiths, G. M. (2002). Secretory lysosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 122-131.
- Bode, W. & Huber, R. (1992). Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur J Biochem* 204, 433-451.
- Bode, W., Engh, R., Musil, D., Laber, B., Stubbs, M., Huber, R. & Turk, V. (1990). Mechanism of interaction of cysteine proteinases and their protein inhibitors as compared to the serine proteinase-inhibitor interaction. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 371 Suppl, 111-118.
- Bonfield, T. L., Panuska, J. R., Konstan, M. W., Hilliard, K. A., Hilliard, J. B., Ghnaim, H. & Berger, M. (1995). Inflammatory cytokines in cystic fibrosis lungs. *Am J Respir Crit Care Med* 152, 2111-2118.
- Borron, P., Veldhuizen, R. A., Lewis, J. F., Possmayer, F., Caveney, A., Inchley, K., McFadden, R. G. & Fraher, L. J. (1996). Surfactant associated protein-A inhibits human lymphocyte proliferation and IL-2 production. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15, 115-121.
- Borron, P., McCormack, F. X., Elhalwagi, B. M., Chroneos, Z. C., Lewis, J. F., Zhu, S., Wright, J. R., Shepherd, V. L., Possmayer, F., et coll. (1998). Surfactant protein A inhibits T cell proliferation via its collagen-like tail and a 210-kDa receptor. *Am J Physiol* 275, L679-686.
- Borron, P., McIntosh, J. C., Korfhagen, T. R., Whitsett, J. A., Taylor, J. & Wright, J. R. (2000). Surfactant-associated protein A inhibits LPS-induced cytokine and nitric oxide production in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278, L840-847.
- Borst, P. & Elferink, R. O. (2002). Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu Rev Biochem* 71, 537-592.
- Brasch, F., Ten Brinke, A., Johnen, G., Ochs, M., Kapp, N., Müller, K. M., Beers, M. F., Fehrenbach, H., Richter, J., et coll. (2002). Involvement of cathepsin H in the processing of the hydrophobic surfactant-associated protein C in type II pneumocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26, 659-670.
- Brinker, K. G., Garner, H. & Wright, J. R. (2003). Surfactant protein A modulates the differentiation of murine bone marrow-derived dendritic cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284, L232-241.
- Brix, K., Lemansky, P. & Herzog, V. (1996). Evidence for extracellularly acting cathepsins mediating thyroid hormone liberation in thyroid epithelial cells. *Endocrinology* 137, 1963-1974.
- Brix, K., Dunkhorst, A., Mayer, K. & Jordans, S. (2008). Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie* 90, 194-207.
- Brockbank, S., Downey, D., Elborn, J. S. & Ennis, M. (2005). Effect of cystic fibrosis exacerbations on neutrophil function. *Int Immunopharmacol* 5, 601-608.

- Brocklehurst, K., Kowlessur, D., O'Driscoll, M., Patel, G., Quenby, S., Salih, E., Templeton, W., Thomas, E. W. & Willenbrock, F. (1987). Substrate-derived two-protonic-state electrophiles as sensitive kinetic specificity probes for cysteine proteinases. Activation of 2-pyridyl disulphides by hydrogen-bonding. *Biochem J* 244, 173-181.
- Brömme, D. & Okamoto, K. (1995). Human cathepsin O2, a novel cysteine protease highly expressed in osteoclastomas and ovary molecular cloning, sequencing and tissue distribution. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 376, 379-384.
- Brömme, D., Smith, R. A., Coles, P. J., Kirschke, H., Storer, A. C. & Krantz, A. (1994). Potent inactivation of cathepsins S and L by peptidyl (acyloxy)methyl ketones. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 375, 343-347.
- Brömme, D., Klaus, J. L., Okamoto, K., Rasnick, D. & Palmer, J. T. (1996a). Peptidyl vinyl sulphones: a new class of potent and selective cysteine protease inhibitors: S2P2 specificity of human cathepsin O2 in comparison with cathepsins S and L. *Biochem J* 315 (Pt 1), 85-89.
- Brömme, D., Okamoto, K., Wang, B. B. & Biroc, S. (1996b). Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 271, 2126-2132.
- Brömme, D., Li, Z., Barnes, M. & Mehler, E. (1999). Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potential, enzymatic characterization, and chromosomal localization. *Biochemistry* 38, 2377-2385.
- Bronsveld, I., Mekus, F., Bijman, J., Ballmann, M., de Jonge, H. R., Laabs, U., Halley, D. J., Ellemunter, H., Mastella, G., et coll. (2001). Chloride conductance and genetic background modulate the cystic fibrosis phenotype of Delta F508 homozygous twins and siblings. *J Clin Invest* 108, 1705-1715.
- Brown, G. R., McGuire, M. J. & Thiele, D. L. (1993). Dipeptidyl peptidase I is enriched in granules of in vitro- and in vivo-activated cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 150, 4733-4742.
- Brown, R. K., Wyatt, H., Price, J. F. & Kelly, F. J. (1996). Pulmonary dysfunction in cystic fibrosis is associated with oxidative stress. *Eur Respir J* 9, 334-339.
- Bruce, M. C., Schuyler, M., Martin, R. J., Starcher, B. C., Tomashefski, J. F., Jr & Wedig, K. E. (1992). Risk factors for the degradation of lung elastic fibers in the ventilated neonate. Implications for impaired lung development in bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis* 146, 204-212.
- Bühling, F., Peitz, U., Krüger, S., Küster, D., Vieth, M., Gebert, I., Roessner, A., Weber, E., Malfertheiner, P. & Wex, T. (2004). Cathepsins K, L, B, X and W are differentially expressed in normal and chronically inflamed gastric mucosa. *Biol Chem* 385, 439-445.
- Burgel, P.-R. & Nadel, J. A. (2004). Roles of epidermal growth factor receptor activation in epithelial cell repair and mucin production in airway epithelium. *Thorax* 59, 992-996.
- Caglic, D., Pungercar, J. R., Pejler, G., Turk, V. & Turk, B. (2007). Glycosaminoglycans facilitate procathepsin B activation through disruption of propeptide-mature enzyme interactions. *J Biol Chem* 282, 33076-33085.
- Campbell, E. J., Silverman, E. K. & Campbell, M. A. (1989). Elastase and cathepsin G of human monocytes. Quantification of cellular content, release in response to stimuli, and heterogeneity in elastase-mediated proteolytic activity. *J Immunol* 143, 2961-2968.

- Cardone, R. A., Casavola, V. & Reshkin, S. J. (2005). The role of disturbed pH dynamics and the Na⁺/H⁺ exchanger in metastasis. *Nat Rev Cancer* 5, 786-795.
- Carmona, E., Dufour, E., Plouffe, C., Takebe, S., Mason, P., Mort, J. S. & Ménard, R. (1996). Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases. *Biochemistry* 35, 8149-8157.
- Casals, C. (2001). Role of surfactant protein A (SP-A)/lipid interactions for SP-A functions in the lung. *Pediatr Pathol Mol Med* 20, 249-268.
- Casals, C., Miguel, E. & Perez-Gil, J. (1993). Tryptophan fluorescence study on the interaction of pulmonary surfactant protein A with phospholipid vesicles. *Biochem J* 296 (Pt 3), 585-593.
- Chapman, H. A., Riese, R. J. & Shi, G. P. (1997). Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* 59, 63-88.
- Cheng, K., Ashby, D. & Smyth, R. (2000). Oral steroids for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* CD000407.
- Cheng, S. H., Rich, D. P., Marshall, J., Gregory, R. J., Welsh, M. J. & Smith, A. E. (1991). Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell* 66, 1027-1036.
- Cherney, M. M., Lecaille, F., Kienitz, M., Nallaseth, F. S., Li, Z., James, M. N. G. & Brömme, D. (2011). Structure-activity analysis of cathepsin K/chondroitin 4-sulfate interactions. *J Biol Chem* 286, 8988-8998.
- Chiellini, C., Costa, M., Novelli, S. E., Amri, E.-Z., Benzi, L., Bertacca, A., Cohen, P., Del Prato, S., Friedman, J. M. & Maffei, M. (2003). Identification of cathepsin K as a novel marker of adiposity in white adipose tissue. *J Cell Physiol* 195, 309-321.
- Chmiel, J. F. & Konstan, M. W. (2005). Anti-inflammatory medications for cystic fibrosis lung disease: selecting the most appropriate agent. *Treat Respir Med* 4, 255-273.
- Chronos, Z. C., Abdolrasulnia, R., Whitsett, J. A., Rice, W. R. & Shepherd, V. L. (1996). Purification of a cell-surface receptor for surfactant protein A. *J Biol Chem* 271, 16375-16383.
- Churg, A., Wang, R. D., Tai, H., Wang, X., Xie, C., Dai, J., Shapiro, S. D. & Wright, J. L. (2003). Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor- α release. *Am J Respir Crit Care Med* 167, 1083-1089.
- Cimerman, N., Brguljan, P. M., Krasovec, M., Suskovic, S. & Kos, J. (2001). Circadian and concentration profile of cathepsin S in sera from healthy subjects and asthmatic patients. *Pflugers Arch* 442, R204-206.
- Cirman, T., Oresić, K., Mazovec, G. D., Turk, V., Reed, J. C., Myers, R. M., Salvesen, G. S. & Turk, B. (2004). Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of Bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *J Biol Chem* 279, 3578-3587.
- Clark, H. W., Reid, K. B. & Sim, R. B. (2000). Collectins and innate immunity in the lung. *Microbes Infect* 2, 273-278.
- Clements, J. A., (1956). Dependence of pressure-volume characteristics of lungs on intrinsic surface active material. *Am J Physiol* 187, 592.

- Coalson, J. J. (2003). Pathology of new bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol* 8, 73-81.
- Condon, J. C., Jeyasuria, P., Faust, J. M. & Mendelson, C. R. (2004). Surfactant protein secreted by the maturing mouse fetal lung acts as a hormone that signals the initiation of parturition. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 4978-4983.
- Cooley, J., McDonald, B., Accurso, F. J., Crouch, E. C. & Remold-O'Donnell, E. (2008). Patterns of neutrophil serine protease-dependent cleavage of surfactant protein D in inflammatory lung disease. *J Leukoc Biol* 83, 946-955.
- Costa, M. G. S., Batista, P. R., Shida, C. S., Robert, C. H., Bisch, P. M. & Pascutti, P. G. (2010). How does heparin prevent the pH inactivation of cathepsin B? Allosteric mechanism elucidated by docking and molecular dynamics. *BMC Genomics* 11 Suppl 5, S5.
- Coulombe, R., Li, Y., Takebe, S., Ménard, R., Mason, P., Mort, J. S. & Cygler, M. (1996). Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of human procathepsin L. *Proteins* 25, 398-400.
- Coussens, L. M., Fingleton, B. & Matrisian, L. M. (2002). Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295, 2387-2392.
- Cygler, M. & Mort, J. S. (1997). Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity. *Biochimie* 79, 645-652.
- Cystic Fibrosis Foundation. (2008). Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2006 Annual Data Report. Bethesda: Cystic Fibrosis Foundation.
- Cystic Fibrosis Foundation. (2011). Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry 2009 Annual Data Report. Bethesda: Cystic Fibrosis Foundation.
- Daniels, C. B. & Orgeig, S. (2003). Pulmonary surfactant: the key to the evolution of air breathing. *News Physiol Sci* 18, 151-157.
- Deb, R., Shakib, F., Reid, K. & Clark, H. (2007). Major house dust mite allergens *Dermatophagoides pteronyssinus* 1 and *Dermatophagoides farinae* 1 degrade and inactivate lung surfactant proteins A and D. *J Biol Chem* 282, 36808-36819.
- Dehrmann, F. M., Coetzer, T. H., Pike, R. N. & Dennison, C. (1995). Mature cathepsin L is substantially active in the ionic milieu of the extracellular medium. *Arch Biochem Biophys* 324, 93-98.
- Dehrmann, F. M., Elliott, E. & Dennison, C. (1996). Reductive activation markedly increases the stability of cathepsins B and L to extracellular ionic conditions. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 377, 391-394.
- Deschamps, K., Cromlish, W., Weicker, S., Lamontagne, S., Huszar, S. L., Gauthier, J. Y., Mudgett, J. S., Guimond, A., Romand, R., et coll. (2011). Genetic and pharmacological evaluation of cathepsin s in a mouse model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 45, 81-87.
- Desmazes, C., Galineau, L., Gauthier, F., Brömme, D. & Lalmanach, G. (2003). Kininogen-derived peptides for investigating the putative vasoactive properties of human cathepsins K and L. *Eur J Biochem* 270, 171-178.
- Deussing, J., Roth, W., Saftig, P., Peters, C., Ploegh, H. L. & Villadangos, J. A. (1998). Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 4516-4521.

- Donabedian, H. (2003). Quorum sensing and its relevance to infectious diseases. *J Infect* 46, 207-214.
- Donaldson, S. H., Bennett, W. D., Zeman, K. L., Knowles, M. R., Tarran, R. & Boucher, R. C. (2006). Mucus clearance and lung function in cystic fibrosis with hypertonic saline. *N Engl J Med* 354, 241-250.
- Drake, F. H., Dodds, R. A., James, I. E., Connor, J. R., Debouck, C., Richardson, S., Lee-Rykaczewski, E., Coleman, L., Rieman, D., et coll. (1996). Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem* 271, 12511-12516.
- Dray, X., Bienvenu, T., Desmazes-Dufeu, N., Dusser, D., Marteau, P. & Hubert, D. (2004). Distal intestinal obstruction syndrome in adults with cystic fibrosis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2, 498-503.
- Duffy, M. J. & Duggan, C. (2004). The urokinase plasminogen activator system: a rich source of tumour markers for the individualised management of patients with cancer. *Clin Biochem* 37, 541-548.
- Dufour, E., Storer, A. C. & Ménard, R. (1995). Peptide aldehydes and nitriles as transition state analog inhibitors of cysteine proteases. *Biochemistry* 34, 9136-9143.
- Dunbar, A. E., 3rd, Wert, S. E., Ikegami, M., Whitsett, J. A., Hamvas, A., White, F. V., Piedboeuf, B., Jobin, C., Guttentag, S. & Nogee, L. M. (2000). Prolonged survival in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency associated with a novel splicing mutation. *Pediatr Res* 48, 275-282.
- Duncan, A. M., Kladis, A., Jennings, G. L., Dart, A. M., Esler, M. & Campbell, D. J. (2000). Kinins in humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278, R897-904.
- Duvoix, A., Mackay, R.-M., Henderson, N., McGreal, E., Postle, A., Reid, K. & Clark, H. (2011). Physiological concentration of calcium inhibits elastase-induced cleavage of a functional recombinant fragment of surfactant protein D. *Immunobiology* 216, 72-79.
- Edwards, V., Cutz, E., Viero, S., Moore, A. M. & Nogee, L. (2005). Ultrastructure of lamellar bodies in congenital surfactant deficiency. *Ultrastruct Pathol* 29, 503-509.
- Elhalwagi, B. M., Damodarasamy, M. & McCormack, F. X. (1997). Alternate amino terminal processing of surfactant protein A results in cysteinyl isoforms required for multimer formation. *Biochemistry* 36, 7018-7025.
- Ellis, V., Scully, M., MacGregor, I. & Kakkar, V. (1982). Inhibition of human factor Xa by various plasma protease inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 701, 24-31.
- Enhörning, G. & Robertson, B. (1972). Lung expansion in the premature rabbit fetus after tracheal deposition of surfactant. *Pediatrics* 50, 58-66.
- Esnard, F. & Gauthier, F. (1983). Rat alpha 1-cysteine proteinase inhibitor. An acute phase reactant identical with alpha 1 acute phase globulin. *J Biol Chem* 258, 12443-12447.
- Ewald, S. E., Engel, A., Lee, J., Wang, M., Bogoy, M. & Barton, G. M. (2011). Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J Exp Med* 208, 643-651.
- Fajardo, I., Svensson, L., Bucht, A. & Pejler, G. (2004). Increased levels of hypoxia-sensitive proteins in allergic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* 170, 477-484.
- Faure, K., Leberre, R. & Guery, B. (2006). [*Pseudomonas aeruginosa* and Surfactant-associated Proteins A and D]. *Med Mal Infect* 36, 63-71.

- Fehrenbach, H. (2001). Alveolar epithelial type II cell: defender of the alveolus revisited. *Respir Res* 2, 33-46.
- Ferrone, M., Raimondo, M. & Scolapio, J. S. (2007). Pancreatic enzyme pharmacotherapy. *Pharmacotherapy* 27, 910-920.
- Fiebiger, E., Meraner, P., Weber, E., Fang, I. F., Stingl, G., Ploegh, H. & Maurer, D. (2001). Cytokines regulate proteolysis in major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by dendritic cells. *J Exp Med* 193, 881-892.
- Fields, G. B., Van Wart, H. E. & Birkedal-Hansen, H. (1987). Sequence specificity of human skin fibroblast collagenase. Evidence for the role of collagen structure in determining the collagenase cleavage site. *J Biol Chem* 262, 6221-6226.
- Findlay, R. D., Taeusch, H. W. & Walther, F. J. (1996). Surfactant replacement therapy for meconium aspiration syndrome. *Pediatrics* 97, 48-52.
- Fox, T., de Miguel, E., Mort, J. S. & Storer, A. C. (1992). Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry* 31, 12571-12576.
- Frerking, I., Günther, A., Seeger, W. & Pison, U. (2001). Pulmonary surfactant: functions, abnormalities and therapeutic options. *Intensive Care Med* 27, 1699-1717.
- Fried, M. D., Durie, P. R., Tsui, L. C., Corey, M., Levison, H. & Pencharz, P. B. (1991). The cystic fibrosis gene and resting energy expenditure. *J Pediatr* 119, 913-916.
- Friedrichs, B., Tepel, C., Reinheckel, T., Deussing, J., von Figura, K., Herzog, V., Peters, C., Saftig, P. & Brix, K. (2003). Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L. *J Clin Invest* 111, 1733-1745.
- Froh, D., Ballard, P. L., Williams, M. C., Gonzales, J., Goerke, J., Odom, M. W. & Gonzales, L. W. (1990). Lamellar bodies of cultured human fetal lung: content of surfactant protein A (SP-A), surface film formation and structural transformation in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1052, 78-89.
- Fujiwara, T., Maeta, H., Chida, S., Morita, T., Watabe, Y. & Abe, T. (1980). Artificial surfactant therapy in hyaline-membrane disease. *Lancet* 1, 55-59.
- Gutmann, H. R. & Fruton, J. S. (1948). On the proteolytic enzymes of animal tissues; an intracellular enzyme related to chymotrypsin. *J Biol Chem* 174, 851-858.
- Gandhi, N. S. & Mancera, R. L. (2008). The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des* 72, 455-482.
- Garcia-Verdugo, I., Tanfin, Z. & Breuiller-Fouche, M. (2010). Surfactant protein A: an immunoregulatory molecule involved in female reproductive biology. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 1779-1783.
- Gardai, S. J., Xiao, Y.-Q., Dickinson, M., Nick, J. A., Voelker, D. R., Greene, K. E. & Henson, P. M. (2003). By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell* 115, 13-23.
- Garnero, P., Borel, O., Byrjalsen, I., Ferreras, M., Drake, F. H., McQueney, M. S., Foged, N. T., Delmas, P. D. & Delaissé, J. M. (1998). The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J Biol Chem* 273, 32347-32352.

- Geertsma, M. F., Nibbering, P. H., Haagsman, H. P., Daha, M. R. & van Furth, R. (1994). Binding of surfactant protein A to C1q receptors mediates phagocytosis of *Staphylococcus aureus* by monocytes. *Am J Physiol* 267, L578-584.
- Gelb, B. D., Shi, G. P., Chapman, H. A. & Desnick, R. J. (1996). Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science* 273, 1236-1238.
- Ghildyal, R., Hartley, C., Varrasso, A., Meanger, J., Voelker, D. R., Anders, E. M. & Mills, J. (1999). Surfactant protein A binds to the fusion glycoprotein of respiratory syncytial virus and neutralizes virion infectivity. *J Infect Dis* 180, 2009-2013.
- Gil, M., McCormack, F. X. & Levine, A. M. (2009). Surfactant protein A modulates cell surface expression of CR3 on alveolar macrophages and enhances CR3-mediated phagocytosis. *J Biol Chem* 284, 7495-7504.
- Giles, G. I., Tasker, K. M. & Jacob, C. (2002). Oxidation of biological thiols by highly reactive disulfide-S-oxides. *Gen Physiol Biophys* 21, 65-72.
- Gillet, L., Roger, S., Besson, P., Lecaille, F., Gore, J., Bounoux, P., Lalmanach, G. & Le Guennec, J.-Y. (2009). Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. *J Biol Chem* 284, 8680-8691.
- Gilljam, H., Andersson, O., Ellin, A., Robertson, B. & Strandvik, B. (1988). Composition and surface properties of the bronchial lipids in adult patients with cystic fibrosis. *Clin Chim Acta* 176, 29-37.
- Gocheva, V. & Joyce, J. A. (2007). Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle* 6, 60-64.
- Gocheva, V., Zeng, W., Ke, D., Klimstra, D., Reinheckel, T., Peters, C., Hanahan, D. & Joyce, J. A. (2006). Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev* 20, 543-556.
- Godat, E., Lecaille, F., Desmazes, C., Duchêne, S., Weidauer, E., Saftig, P., Brömme, D., Vandier, C. & Lalmanach, G. (2004). Cathepsin K: a cysteine protease with unique kinin-degrading properties. *Biochem J* 383, 501-506.
- Godat, E., Chowdhury, S., Lecaille, F., Belghazi, M., Purisima, E. O. & Lalmanach, G. (2005). Inhibition of a cathepsin L-like cysteine protease by a chimeric propeptide-derived inhibitor. *Biochemistry* 44, 10486-10493.
- Godat, E., Hervé-Grépinet, V., Veillard, F., Lecaille, F., Belghazi, M., Brömme, D. & Lalmanach, G. (2008). Regulation of cathepsin K activity by hydrogen peroxide. *Biol Chem* 389, 1123-1126.
- Goulet, B., Baruch, A., Moon, N.-S., Poirier, M., Sansregret, L. L., Erickson, A., Bogoy, M. & Nepveu, A. (2004). A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. *Mol Cell* 14, 207-219.
- Grasemann, H. (2010). Do the cysteine proteinases cathepsin B and S contribute to cystic fibrosis lung disease? *Pediatr Pulmonol* 45, 845-846.
- Greally, P., Hussein, M. J., Cook, A. J., Sampson, A. P., Piper, P. J. & Price, J. F. (1993). Sputum tumour necrosis factor-alpha and leukotriene concentrations in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 68, 389-392.

- Greally, P., Hussain, M. J., Vergani, D. & Price, J. F. (1994). Interleukin-1 alpha, soluble interleukin-2 receptor, and IgG concentrations in cystic fibrosis treated with prednisolone. *Arch Dis Child* 71, 35-39.
- Green, G. D., Kembhavi, A. A., Davies, M. E. & Barrett, A. J. (1984). Cystatin-like cysteine proteinase inhibitors from human liver. *Biochem J* 218, 939-946.
- Gregory, T. J., Longmore, W. J., Moxley, M. A., Whitsett, J. A., Reed, C. R., Fowler, A. A., 3rd, Hudson, L. D., Maunder, R. J., Crim, C. & Hyers, T. M. (1991). Surfactant chemical composition and biophysical activity in acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 88, 1976-1981.
- Griese, M. (1999). Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J* 13, 1455-1476.
- Griese, M., Birrer, P. & Demirsoy, A. (1997). Pulmonary surfactant in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 10, 1983-1988.
- Griese, M., von Bredow, C. & Birrer, P. (2001). Reduced proteolysis of surfactant protein A and changes of the bronchoalveolar lavage fluid proteome by inhaled alpha 1-protease inhibitor in cystic fibrosis. *Electrophoresis* 22, 165-171.
- Griese, M., Wiesener, A., Lottspeich, F. & von Bredow, C. (2003). Limited proteolysis of surfactant protein D causes a loss of its calcium-dependent lectin functions. *Biochim Biophys Acta* 1638, 157-163.
- Griese, M., Essl, R., Schmidt, R., Rietschel, E., Ratjen, F., Ballmann, M. & Paul, K. (2004). Pulmonary surfactant, lung function, and endobronchial inflammation in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 170, 1000-1005.
- Grimbert, D., Vecellio, L., Delépine, P., Attucci, S., Boissinot, E., Poncin, A., Gauthier, F., Valat, C., Saudubray, F., et coll. (2003). Characteristics of EPI-hNE4 aerosol: a new elastase inhibitor for treatment of cystic fibrosis. *J Aerosol Med* 16, 121-129.
- Grubb, A., Abrahamson, M., Olafsson, I., Trojnar, J., Kasprzykowska, R., Kasprzykowski, F. & Grzonka, Z. (1990). Synthesis of cysteine proteinase inhibitors structurally based on the proteinase interacting N-terminal region of human cystatin C. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 371 Suppl, 137-144.
- Guicciardi, M. E., Deussing, J., Miyoshi, H., Bronk, S. F., Svingen, P. A., Peters, C., Kaufmann, S. H. & Gores, G. J. (2000). Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* 106, 1127-1137.
- Guinec, N., Dalet-Fumeron, V. & Pagano, M. (1993). "In vitro" study of basement membrane degradation by the cysteine proteinases, cathepsins B, B-like and L. Digestion of collagen IV, laminin, fibronectin, and release of gelatinase activities from basement membrane fibronectin. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 374, 1135-1146.
- Gupta, G. & Surolia, A. (2007). Collectins: sentinels of innate immunity. *Bioessays* 29, 452-464.
- Guttentag, S., Robinson, L., Zhang, P., Brasch, F., Bühling, F. & Beers, M. (2003). Cysteine protease activity is required for surfactant protein B processing and lamellar body genesis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28, 69-79.
- Ha, S.-D., Martins, A., Khazaie, K., Han, J., Chan, B. M. C. & Kim, S. O. (2008). Cathepsin B is involved in the trafficking of TNF-alpha-containing vesicles to the plasma membrane in macrophages. *J Immunol* 181, 690-697.

- Haagsman, H. P., Hogenkamp, A., van Eijk, M. & Veldhuizen, E. J. A. (2008). Surfactant collectins and innate immunity. *Neonatology* 93, 288-294.
- Håkansson, K., Lim, N. K., Hoppe, H. J. & Reid, K. B. (1999). Crystal structure of the trimeric alpha-helical coiled-coil and the three lectin domains of human lung surfactant protein D. *Structure* 7, 255-264.
- Halliday, H. L. (2008). Surfactants: past, present and future. *J Perinatol* 28 Suppl 1, S47-56.
- Hamid, Q. & Tulic, M. (2009). Immunobiology of asthma. *Annu Rev Physiol* 71, 489-507.
- Hamm, H., Kroegel, C. & Hohlfeld, J. (1996). Surfactant: a review of its functions and relevance in adult respiratory disorders. *Respir Med* 90, 251-270.
- Hamvas, A., Noguee, L. M., Mallory, G. B., Jr, Spray, T. L., Huddleston, C. B., August, A., Dehner, L. P., deMello, D. E., Moxley, M., et coll. (1997). Lung transplantation for treatment of infants with surfactant protein B deficiency. *J Pediatr* 130, 231-239.
- Harth, G., Andrews, N., Mills, A. A., Engel, J. C., Smith, R. & McKerrow, J. H. (1993). Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 58, 17-24.
- Hassett, D. J., Cuppoletti, J., Trapnell, B., Lyman, S. V., Rowe, J. J., Yoon, S. S., Hilliard, G. M., Parvatiyar, K., Kamani, M. C., et coll. (2002). Anaerobic metabolism and quorum sensing by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in chronically infected cystic fibrosis airways: rethinking antibiotic treatment strategies and drug targets. *Adv Drug Deliv Rev* 54, 1425-1443.
- Havenith, C. E., van Miert, P. P., Breedijk, A. J., Beelen, R. H. & Hoefsmit, E. C. (1993). Migration of dendritic cells into the draining lymph nodes of the lung after intratracheal instillation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9, 484-488.
- Hawgood, S., Derrick, M. & Poulain, F. (1998). Structure and properties of surfactant protein B. *Biochim Biophys Acta* 1408, 150-160.
- Head, J. F., Mealy, T. R., McCormack, F. X. & Seaton, B. A. (2003). Crystal structure of trimeric carbohydrate recognition and neck domains of surfactant protein A. *J Biol Chem* 278, 43254-43260.
- Herting, E., Gefeller, O., Land, M., van Sonderen, L., Harms, K. & Robertson, B. (2000). Surfactant treatment of neonates with respiratory failure and group B streptococcal infection. Members of the Collaborative European Multicenter Study Group. *Pediatrics* 106, 957-964.
- Hervé-Grépinet, V., Veillard, F., Godat, E., Heuzé-Vourc'h, N., Lecaille, F. & Lalmanach, G. (2008). Extracellular catalase activity protects cysteine cathepsins from inactivation by hydrogen peroxide. *FEBS Lett* 582, 1307-1312.
- Hickman-Davis, J., Gibbs-Erwin, J., Lindsey, J. R. & Matalon, S. (1999). Surfactant protein A mediates mycoplasma-cidal activity of alveolar macrophages by production of peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 4953-4958.
- Hirakawa, H., Pierce, R. A., Bingol-Karakoc, G., Karaaslan, C., Weng, M., Shi, G.-P., Saad, A., Weber, E., Mariani, T. J., et coll. (2007). Cathepsin S deficiency confers protection from neonatal hyperoxia-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 176, 778-785.
- Hiraoka, M., Abe, A., Lu, Y., Yang, K., Han, X., Gross, R. W. & Shayman, J. A. (2006). Lysosomal phospholipase A2 and phospholipidosis. *Mol Cell Biol* 26, 6139-6148.

Hirche, T. O., Crouch, E. C., Espinola, M., Brokelman, T. J., Mecham, R. P., DeSilva, N., Cooley, J., Remold-O'Donnell, E. & Belaaouaj, A. (2004). Neutrophil serine proteinases inactivate surfactant protein D by cleaving within a conserved subregion of the carbohydrate recognition domain. *J Biol Chem* 279, 27688-27698.

Høiby, N. & Koch, C. (1990). Cystic fibrosis. 1. Pseudomonas aeruginosa infection in cystic fibrosis and its management. *Thorax* 45, 881-884.

Holm, B. A., Keicher, L., Liu, M. Y., Sokolowski, J. & Enhorning, G. (1991). Inhibition of pulmonary surfactant function by phospholipases. *J Appl Physiol* 71, 317-321.

Holt, P. G., Schon-Hegrad, M. A. & Oliver, J. (1988). MHC class II antigen-bearing dendritic cells in pulmonary tissues of the rat. Regulation of antigen presentation activity by endogenous macrophage populations. *J Exp Med* 167, 262-274.

Honey, K. & Rudensky, A. Y. (2003). Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 3, 472-482.

Hook, V., Yasothornsrikul, S., Greenbaum, D., Medzihradszky, K. F., Troutner, K., Toneff, T., Bunday, R., Logrinova, A., Reinheckel, T., et coll. (2004). Cathepsin L and Arg/Lys aminopeptidase: a distinct prohormone processing pathway for the biosynthesis of peptide neurotransmitters and hormones. *Biol Chem* 385, 473-480.

Hook, V., Toneff, T., Bogyo, M., Greenbaum, D., Medzihradszky, K. F., Neveu, J., Lane, W., Hook, G. & Reisine, T. (2005). Inhibition of cathepsin B reduces beta-amyloid production in regulated secretory vesicles of neuronal chromaffin cells: evidence for cathepsin B as a candidate beta-secretase of Alzheimer's disease. *Biol Chem* 386, 931-940.

Hook, V., Schechter, I., Demuth, H.-U. & Hook, G. (2008). Alternative pathways for production of beta-amyloid peptides of Alzheimer's disease. *Biol Chem* 389, 993-1006.

Hoppe, H. J., Barlow, P. N. & Reid, K. B. (1994). A parallel three stranded alpha-helical bundle at the nucleation site of collagen triple-helix formation. *FEBS Lett* 344, 191-195.

Horowitz, A. D., Elledge, B., Whitsett, J. A. & Baatz, J. E. (1992). Effects of lung surfactant proteolipid SP-C on the organization of model membrane lipids: a fluorescence study. *Biochim Biophys Acta* 1107, 44-54.

Horowitz, A. D., Baatz, J. E. & Whitsett, J. A. (1993). Lipid effects on aggregation of pulmonary surfactant protein SP-C studied by fluorescence energy transfer. *Biochemistry* 32, 9513-9523.

Hou, W. S., Li, Z., Gordon, R. E., Chan, K., Klein, M. J., Levy, R., Keysser, M., Keyszer, G. & Brömme, D. (2001). Cathepsin k is a critical protease in synovial fibroblast-mediated collagen degradation. *Am J Pathol* 159, 2167-2177.

Hou, W.-S., Li, W., Keyszer, G., Weber, E., Levy, R., Klein, M. J., Gravallese, E. M., Goldring, S. R. & Brömme, D. (2002). Comparison of cathepsins K and S expression within the rheumatoid and osteoarthritic synovium. *Arthritis Rheum* 46, 663-674.

Hou, W.-S., Li, Z., Büttner, F. H., Bartnik, E. & Brömme, D. (2003). Cleavage site specificity of cathepsin K toward cartilage proteoglycans and protease complex formation. *Biol Chem* 384, 891-897.

Houghton, A. M., Mouded, M. & Shapiro, S. D. (2008). Common origins of lung cancer and COPD. *Nat Med* 14, 1023-1024.

- Hu, L. Y. & Abeles, R. H. (1990). Inhibition of cathepsin B and papain by peptidyl alpha-keto esters, alpha-keto amides, alpha-diketones, and alpha-keto acids. *Arch Biochem Biophys* 281, 271-274.
- Hudson, N. W. & Koo, P. H. (1982). Subunit and primary structure of a mouse alpha-macroglobulin, a human alpha 2-macroglobulin homologue. *Biochim Biophys Acta* 704, 290-303.
- Hull, J., South, M., Phelan, P. & Grimwood, K. (1997). Surfactant composition in infants and young children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 156, 161-165.
- Hummel, K. M., Petrow, P. K., Franz, J. K., Müller-Ladner, U., Aicher, W. K., Gay, R. E., Brömme, D. & Gay, S. (1998). Cysteine proteinase cathepsin K mRNA is expressed in synovium of patients with rheumatoid arthritis and is detected at sites of synovial bone destruction. *J Rheumatol* 25, 1887-1894.
- Humphrey, W., Dalke, A. & Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J Mol Graph* 14, 33-38, 27-28.
- Hussain, S. (2004). Role of surfactant protein A in the innate host defense and autoimmunity. *Autoimmunity* 37, 125-130.
- Hwang, S.-R., Stoka, V., Turk, V. & Hook, V. Y. H. (2005). The novel bovine serpin endopin 2C demonstrates selective inhibition of the cysteine protease cathepsin L compared to the serine protease elastase, in cross-class inhibition. *Biochemistry* 44, 7757-7767.
- Ikegami, M., Korfhagen, T. R., Whitsett, J. A., Bruno, M. D., Wert, S. E., Wada, K. & Jobe, A. H. (1998). Characteristics of surfactant from SP-A-deficient mice. *Am J Physiol* 275, L247-254.
- Illy, C., Quraishi, O., Wang, J., Purisima, E., Vernet, T. & Mort, J. S. (1997). Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *J Biol Chem* 272, 1197-1202.
- Ishidoh, K. & Kominami, E. (2002). Processing and activation of lysosomal proteinases. *Biol Chem* 383, 1827-1831.
- Ito, Y. & Mason, R. J. (2010). The effect of interleukin-13 (IL-13) and interferon- γ (IFN- γ) on expression of surfactant proteins in adult human alveolar type II cells in vitro. *Respir Res* 11, 157.
- Jain, D., Dodia, C., Fisher, A. B. & Bates, S. R. (2005). Pathways for clearance of surfactant protein A from the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289, L1011-1018.
- Jedezsko, C. & Sloane, B. F. (2004). Cysteine cathepsins in human cancer. *Biol Chem* 385, 1017-1027.
- Jobe, A. H. (1993). Pulmonary surfactant therapy. *N Engl J Med* 328, 861-868.
- Jobe, A. H. (2006). Mechanisms to explain surfactant responses. *Biol Neonate* 89, 298-302.
- Johansson, J. (2001). Membrane properties and amyloid fibril formation of lung surfactant protein C. *Biochem Soc Trans* 29, 601-606.
- Johnson, D. A., Barrett, A. J. & Mason, R. W. (1986). Cathepsin L inactivates alpha 1-proteinase inhibitor by cleavage in the reactive site region. *J Biol Chem* 261, 14748-14751.
- Jones, A. P. & Wallis, C. (2010). Dornase alfa for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev* CD001127.

- Joyce, J. A. & Hanahan, D. (2004). Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer. *Cell Cycle* 3, 1516-1619.
- Jutras, I. & Reudelhuber, T. L. (1999). Prorenin processing by cathepsin B in vitro and in transfected cells. *FEBS Lett* 443, 48-52.
- Kabha, K., Schmiegner, J., Keisari, Y., Parolis, H., Schlepper-Schaeffer, J. & Ofek, I. (1997). SP-A enhances phagocytosis of *Klebsiella* by interaction with capsular polysaccharides and alveolar macrophages. *Am J Physiol* 272, L344-352.
- Kalina, M., Blau, H., Riklis, S. & Kravtsov, V. (1995). Interaction of surfactant protein A with bacterial lipopolysaccharide may affect some biological functions. *Am J Physiol* 268, L144-151.
- Karrer, K. M., Peiffer, S. L. & DiTomas, M. E. (1993). Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 3063-3067.
- Kasabova, M., Saidi, A., Naudin, C., Sage, J., Lecaille, F. & Lalmanach, G. (2011). Cysteine Cathepsins: Markers and Therapy Targets in Lung Disorders. *Clinical Review in Bone and Mineral Metabolism* 9, 148-161.
- Katunuma, N., Matsunaga, Y., Matsui, A., Kakegawa, H., Endo, K., Inubushi, T., Saibara, T., Ohba, Y. & Kakiuchi, T. (1998). Novel physiological functions of cathepsins B and L on antigen processing and osteoclastic bone resorption. *Adv Enzyme Regul* 38, 235-251.
- Katunuma, N., Murata, E., Kakegawa, H., Matsui, A., Tsuzuki, H., Tsuge, H., Turk, D., Turk, V., Fukushima, M., et coll. (1999). Structure based development of novel specific inhibitors for cathepsin L and cathepsin S in vitro and in vivo. *FEBS Lett* 458, 6-10.
- Kempson, G. E., Muir, H., Pollard, C. & Tuke, M. (1973). The tensile properties of the cartilage of human femoral condyles related to the content of collagen and glycosaminoglycans. *Biochim Biophys Acta* 297, 456-472.
- Kempson, G. E., Tuke, M. A., Dingle, J. T., Barrett, A. J. & Horsfield, P. H. (1976). The effects of proteolytic enzymes on the mechanical properties of adult human articular cartilage. *Biochim Biophys Acta* 428, 741-760.
- Kerem, E., Reisman, J., Corey, M., Canny, G. J. & Levison, H. (1992). Prediction of mortality in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 326, 1187-1191.
- Kerem, E., Hirawat, S., Armoni, S., Yaakov, Y., Shoseyov, D., Cohen, M., Nissim-Rafinia, M., Blau, H., Rivlin, J., et coll. (2008). Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. *Lancet* 372, 719-727.
- King, R. J., Klass, D. J., Gikas, E. G. & Clements, J. A. (1973). Isolation of apoproteins from canine surface active material. *Am J Physiol* 224, 788-795.
- King, R. J., Carmichael, M. C. & Horowitz, P. M. (1983). Reassembly of lipid-protein complexes of pulmonary surfactant. Proposed mechanism of interaction. *J Biol Chem* 258, 10672-10680.
- King, R. J., Phillips, M. C., Horowitz, P. M. & Dang, S. C. (1986). Interaction between the 35 kDa apolipoprotein of pulmonary surfactant and saturated phosphatidylcholines. Effects of temperature. *Biochim Biophys Acta* 879, 1-13.
- Kirschke, H., Wikstrom, P. & Shaw, E. (1988). Active center differences between cathepsins L and B: the S1 binding region. *FEBS Lett* 228, 128-130.

- Kirschke, H., Barrett, A. J. & Rawlings, N. D. (1995). Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile* 2, 1581-1643.
- Kishore, U., Ghai, R., Greenhough, T. J., Shrive, A. K., Bonifati, D. M., Gadjeva, M. G., Waters, P., Kojouharova, M. S., Chakraborty, T. & Agrawal, A. (2004). Structural and functional anatomy of the globular domain of complement protein C1q. *Immunol Lett* 95, 113-128.
- Kishore, U., Bernal, A. L., Kamran, M. F., Saxena, S., Singh, M., Sarma, P. U., Madan, T. & Chakraborty, T. (2005). Surfactant proteins SP-A and SP-D in human health and disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 53, 399-417.
- Kishore, U., Greenhough, T. J., Waters, P., Shrive, A. K., Ghai, R., Kamran, M. F., Bernal, A. L., Reid, K. B. M., Madan, T. & Chakraborty, T. (2006). Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol Immunol* 43, 1293-1315.
- Klein, J. M., Thompson, M. W., Snyder, J. M., George, T. N., Whitsett, J. A., Bell, E. F., McCray, P. B., Jr & Noguee, L. M. (1998). Transient surfactant protein B deficiency in a term infant with severe respiratory failure. *J Pediatr* 132, 244-248.
- Knaapi, J., Lukkarinen, H., Kiviranta, R., Steiner, A., Lassus, P., Andersson, S. & Kääpä, P. (2006). Cathepsin K expression is diminished in infants with bronchopulmonary dysplasia. *Acta Paediatr* 95, 1298-1300.
- Kohri, K., Ueki, I. F. & Nadel, J. A. (2002). Neutrophil elastase induces mucin production by ligand-dependent epidermal growth factor receptor activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283, L531-540.
- Konstan, M. W., Byard, P. J., Hoppel, C. L. & Davis, P. B. (1995). Effect of high-dose ibuprofen in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 332, 848-854.
- Konttinen, Y. T., Mandelin, J., Li, T.-F., Salo, J., Lassus, J., Liljeström, M., Hukkanen, M., Takagi, M., Virtanen, I. & Santavirta, S. (2002). Acidic cysteine endoproteinase cathepsin K in the degeneration of the superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 46, 953-960.
- Kopelman, H., Durie, P., Gaskin, K., Weizman, Z. & Forstner, G. (1985). Pancreatic fluid secretion and protein hyperconcentration in cystic fibrosis. *N Engl J Med* 312, 329-334.
- Korfhagen, T. R., Bruno, M. D., Ross, G. F., Huelsman, K. M., Ikegami, M., Jobe, A. H., Wert, S. E., Stripp, B. R., Morris, R. E., et coll. (1996). Altered surfactant function and structure in SP-A gene targeted mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 9594-9599.
- Korkmaz, B., Moreau, T. & Gauthier, F. (2008). Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie* 90, 227-242.
- Korkmaz, B., Horwitz, M. S., Jenne, D. E. & Gauthier, F. (2010). Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol Rev* 62, 726-759.
- Koziel, H., Phelps, D. S., Fishman, J. A., Armstrong, M. Y., Richards, F. F. & Rose, R. M. (1998). Surfactant protein-A reduces binding and phagocytosis of pneumocystis carinii by human alveolar macrophages in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18, 834-843.
- Krantz, A. (1994). Peptidyl (acyloxy)methanes as quiescent affinity labels for cysteine proteinases. *Meth Enzymol* 244, 656-671.

- Krupa, J. C., Hasnain, S., Nägler, D. K., Ménard, R. & Mort, J. S. (2002). S2' substrate specificity and the role of His110 and His111 in the exopeptidase activity of human cathepsin B. *Biochem J* 361, 613-619.
- Kruszewski, W. J., Rzepko, R., Wojtacki, J., Skokowski, J., Kopacz, A., Jaśkiewicz, K. & Drucis, K. (2004). Overexpression of cathepsin B correlates with angiogenesis in colon adenocarcinoma. *Neoplasma* 51, 38-43.
- Kudo, K., Sano, H., Takahashi, H., Kuronuma, K., Yokota, S.-ichi, Fujii, N., Shimada, K.-ichi, Yano, I., Kumazawa, Y., et coll. (2004). Pulmonary collectins enhance phagocytosis of *Mycobacterium avium* through increased activity of mannose receptor. *J Immunol* 172, 7592-7602.
- Kulig, P., Kantyka, T., Zabel, B. A., Banas, M., Chyra, A., Stefanska, A., Tu, H., Allen, S. J., Handel, T. M., et coll. (2011). Regulation of chemerin chemoattractant and antibacterial activity by human cysteine cathepsins. *J Immunol* 187, 1403-1410.
- Kuroki, Y. & Akino, T. (1991). Pulmonary surfactant protein A (SP-A) specifically binds dipalmitoylphosphatidylcholine. *J Biol Chem* 266, 3068-3073.
- Kuroki, Y., Mason, R. J. & Voelker, D. R. (1988). Pulmonary surfactant apoprotein A structure and modulation of surfactant secretion by rat alveolar type II cells. *J Biol Chem* 263, 3388-3394.
- Kuroki, Y., McCormack, F. X., Ogasawara, Y., Mason, R. J. & Voelker, D. R. (1994). Epitope mapping for monoclonal antibodies identifies functional domains of pulmonary surfactant protein A that interact with lipids. *J Biol Chem* 269, 29793-29800.
- Kuroki, Y., Takahashi, M. & Nishitani, C. (2007). Pulmonary collectins in innate immunity of the lung. *Cell Microbiol* 9, 1871-1879.
- Kuronuma, K., Sano, H., Kato, K., Kudo, K., Hyakushima, N., Yokota, S.-ichi, Takahashi, H., Fujii, N., Suzuki, H., et coll. (2004). Pulmonary surfactant protein A augments the phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* by alveolar macrophages through a casein kinase 2-dependent increase of cell surface localization of scavenger receptor A. *J Biol Chem* 279, 21421-21430.
- Lafarge, J.-C., Naour, N., Clément, K. & Guerre-Millo, M. (2010). Cathepsins and cystatin C in atherosclerosis and obesity. *Biochimie* 92, 1580-1586.
- Lai, H. J., Cheng, Y., Cho, H., Kosorok, M. R. & Farrell, P. M. (2004). Association between initial disease presentation, lung disease outcomes, and survival in patients with cystic fibrosis. *Am J Epidemiol* 159, 537-546.
- Lalmanach, G., Lecaille, F., Chagas, J. R., Authié, E., Scharfstein, J., Juliano, M. A. & Gauthier, F. (1998). Inhibition of trypanosomal cysteine proteinases by their propeptides. *J Biol Chem* 273, 25112-25116.
- Lalmanach, G., Diot, E., Godat, E., Lecaille, F. & Hervé-Grépinet, V. (2006). Cysteine cathepsins and caspases in silicosis. *Biol Chem* 387, 863-870.
- Lalmanach, G., Naudin, C., Lecaille, F. & Fritz, H. (2010). Kininogens: More than cysteine protease inhibitors and kinin precursors. *Biochimie* 92, 1568-1579.
- Le, Q. T., Gomez, G., Zhao, W., Hu, J., Xia, H.-Z., Fukuoka, Y., Katunuma, N. & Schwartz, L. B. (2011). Processing of human protryptase in mast cells involves cathepsins L, B, and C. *J Immunol* 187, 1912-1918.

LeVine, A. M., Bruno, M. D., Huelsman, K. M., Ross, G. F., Whitsett, J. A. & Korfhagen, T. R. (1997). Surfactant protein A-deficient mice are susceptible to group B streptococcal infection. *J Immunol* 158, 4336-4340.

LeVine, A. M., Kurak, K. E., Bruno, M. D., Stark, J. M., Whitsett, J. A. & Korfhagen, T. R. (1998). Surfactant protein-A-deficient mice are susceptible to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19, 700-708.

LeVine, A. M., Whitsett, J. A., Hartshorn, K. L., Crouch, E. C. & Korfhagen, T. R. (2001). Surfactant protein D enhances clearance of influenza A virus from the lung in vivo. *J Immunol* 167, 5868-5873.

LeVine, A. M., Hartshorn, K., Elliott, J., Whitsett, J. & Korfhagen, T. (2002). Absence of SP-A modulates innate and adaptive defense responses to pulmonary influenza infection. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 282, L563-572.

Lecaille, F., Choe, Y., Brandt, W., Li, Z., Craik, C. S. & Brömme, D. (2002a). Selective inhibition of the collagenolytic activity of human cathepsin K by altering its S2 subsite specificity. *Biochemistry* 41, 8447-8454.

Lecaille, F., Kaleta, J. & Brömme, D. (2002b). Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev* 102, 4459-4488.

Lecaille, F., Chowdhury, S., Purisima, E., Brömme, D. & Lalmanach, G. (2007a). The S2 subsites of cathepsins K and L and their contribution to collagen degradation. *Protein Sci* 16, 662-670.

Lecaille, F., Vandier, C., Godat, E., Hervé-Grépinet, V., Brömme, D. & Lalmanach, G. (2007b). Modulation of hypotensive effects of kinins by cathepsin K. *Arch Biochem Biophys* 459, 129-136.

Lecaille, F., Brömme, D. & Lalmanach, G. (2008). Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie* 90, 208-226.

Lemaire, R., Huet, G., Zerimech, F., Grard, G., Fontaine, C., Duquesnoy, B. & Flipo, R. M. (1997). Selective induction of the secretion of cathepsins B and L by cytokines in synovial fibroblast-like cells. *Br J Rheumatol* 36, 735-743.

Lemjabbar, H., Li, D., Gallup, M., Sidhu, S., Drori, E. & Basbaum, C. (2003). Tobacco smoke-induced lung cell proliferation mediated by tumor necrosis factor alpha-converting enzyme and amphiregulin. *J Biol Chem* 278, 26202-26207.

Lenarcic, B. & Turk, V. (1999). Thyroglobulin type-1 domains in equistatin inhibit both papain-like cysteine proteinases and cathepsin D. *J Biol Chem* 274, 563-566.

Lenarcic, B., Ritonja, A., Strukelj, B., Turk, B. & Turk, V. (1997). Equistatin, a new inhibitor of cysteine proteinases from *Actinia equina*, is structurally related to thyroglobulin type-1 domain. *J Biol Chem* 272, 13899-13903.

Li, Z., Hou, W.-S., Escalante-Torres, C. R., Gelb, B. D. & Bromme, D. (2002). Collagenase activity of cathepsin K depends on complex formation with chondroitin sulfate. *J Biol Chem* 277, 28669-28676.

Li, Z., Yasuda, Y., Li, W., Bogyo, M., Katz, N., Gordon, R. E., Fields, G. B. & Brömme, D. (2004). Regulation of collagenase activities of human cathepsins by glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 279, 5470-5479.

- Liau, D. F., Yin, N. X., Huang, J. & Ryan, S. F. (1996). Effects of human polymorphonuclear leukocyte elastase upon surfactant proteins in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1302, 117-128.
- Lieberman, J. (1968). Dornase aerosol effect on sputum viscosity in cases of cystic fibrosis. *JAMA* 205, 312-313.
- Linke, M. J., Harris, C. E., Korfhagen, T. R., McCormack, F. X., Ashbaugh, A. D., Steele, P., Whitsett, J. A. & Walzer, P. D. (2001). Immunosuppressed surfactant protein A-deficient mice have increased susceptibility to *Pneumocystis carinii* infection. *J Infect Dis* 183, 943-952.
- Linke, M., Herzog, V. & Brix, K. (2002). Trafficking of lysosomal cathepsin B-green fluorescent protein to the surface of thyroid epithelial cells involves the endosomal/lysosomal compartment. *J Cell Sci* 115, 4877-4889.
- Linke, M., Gordon, R. E., Brillard, M., Lecaille, F., Lalmanach, G. & Brömme, D. (2006). Degradation of apolipoprotein B-100 by lysosomal cysteine cathepsins. *Biol Chem* 387, 1295-1303.
- Linnevers, C., Smeekens, S. P. & Brömme, D. (1997). Human cathepsin W, a putative cysteine protease predominantly expressed in CD8⁺ T-lymphocytes. *FEBS Lett* 405, 253-259.
- Linsdell, P. & Hanrahan, J. W. (1998). Glutathione permeability of CFTR. *Am J Physiol* 275, C323-326.
- Linsdell, P., Tabcharani, J. A., Rommens, J. M., Hou, Y. X., Chang, X. B., Tsui, L. C., Riordan, J. R. & Hanrahan, J. W. (1997). Permeability of wild-type and mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator chloride channels to polyatomic anions. *J Gen Physiol* 110, 355-364.
- Liu, J., Sukhova, G. K., Sun, J.-S., Xu, W.-H., Libby, P. & Shi, G.-P. (2004). Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 1359-1366.
- Liu, X., Kim, S., Dai, Q. H., Brodsky, B. & Baum, J. (1998). Nuclear magnetic resonance shows asymmetric loss of triple helix in peptides modeling a collagen mutation in brittle bone disease. *Biochemistry* 37, 15528-15533.
- López-Otín, C. & Bond, J. S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem* 283, 30433-30437.
- Loussouarn, G., Demolombe, S., Mohammad-Panah, R., Escande, D. & Baró, I. (1996). Expression of CFTR controls cAMP-dependent activation of epithelial K⁺ currents. *Am J Physiol* 271, C1565-1573.
- Lu, J., Teh, C., Kishore, U. & Reid, K. B. M. (2002). Collectins and ficolins: sugar pattern recognition molecules of the mammalian innate immune system. *Biochim Biophys Acta* 1572, 387-400.
- Lutgens, E., Faber, B., Schapira, K., Evelo, C. T. A., van Haften, R., Heeneman, S., Cleutjens, K. B. J. M., Bijmens, A. P., Beckers, L., et coll. (2005). Gene profiling in atherosclerosis reveals a key role for small inducible cytokines: validation using a novel monocyte chemoattractant protein monoclonal antibody. *Circulation* 111, 3443-3452.
- Lutgens, S. P. M., Cleutjens, K. B. J. M., Daemen, M. J. A. P. & Heeneman, S. (2007). Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. *FASEB J* 21, 3029-3041.
- Mach, L., Mort, J. S. & Glössl, J. (1994). Maturation of human procathepsin B. Proenzyme activation and proteolytic processing of the precursor to the mature proteinase, in vitro, are primarily unimolecular processes. *J Biol Chem* 269, 13030-13035.

- Machleidt, W., Thiele, U., Laber, B., Assfalg-Machleidt, I., Esterl, A., Wiegand, G., Kos, J., Turk, V. & Bode, W. (1989). Mechanism of inhibition of papain by chicken egg white cystatin. Inhibition constants of N-terminally truncated forms and cyanogen bromide fragments of the inhibitor. *FEBS Lett* 243, 234-238.
- Madan, T., Eggleton, P., Kishore, U., Strong, P., Aggrawal, S. S., Sarma, P. U. & Reid, K. B. (1997a). Binding of pulmonary surfactant proteins A and D to *Aspergillus fumigatus* conidia enhances phagocytosis and killing by human neutrophils and alveolar macrophages. *Infect Immun* 65, 3171-3179.
- Madan, T., Kishore, U., Shah, A., Eggleton, P., Strong, P., Wang, J. Y., Aggrawal, S. S., Sarma, P. U. & Reid, K. B. (1997b). Lung surfactant proteins A and D can inhibit specific IgE binding to the allergens of *Aspergillus fumigatus* and block allergen-induced histamine release from human basophils. *Clin Exp Immunol* 110, 241-249.
- Magoon, M. W., Wright, J. R., Baritussio, A., Williams, M. C., Goerke, J., Benson, B. J., Hamilton, R. L. & Clements, J. A. (1983). Subfractionation of lung surfactant. Implications for metabolism and surface activity. *Biochim Biophys Acta* 750, 18-31.
- Mall, M., Bleich, M., Greger, R., Schreiber, R. & Kunzelmann, K. (1998). The amiloride-inhibitable Na⁺ conductance is reduced by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in normal but not in cystic fibrosis airways. *J Clin Invest* 102, 15-21.
- Malloy, J. L., Veldhuizen, R. A. W., Thibodeaux, B. A., O'Callaghan, R. J. & Wright, J. R. (2005). *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288, L409-418.
- Mander, A., Langton-Hewer, S., Bernhard, W., Warner, J. O. & Postle, A. D. (2002). Altered phospholipid composition and aggregate structure of lung surfactant is associated with impaired lung function in young children with respiratory infections. *Am J Respir Cell Mol Biol* 27, 714-721.
- Marcos, V., Zhou, Z., Yildirim, A. O., Bohla, A., Hector, A., Vitkov, L., Wiedenbauer, E.-M., Krautgartner, W. D., Stoiber, W., et coll. (2010). CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nat Med* 16, 1018-1023.
- Mariencheck, W. I., Savov, J., Dong, Q., Tino, M. J. & Wright, J. R. (1999). Surfactant protein A enhances alveolar macrophage phagocytosis of a live, mucoid strain of *P. aeruginosa*. *Am J Physiol* 277, L777-786.
- Mariencheck, W. I., Alcorn, J. F., Palmer, S. M. & Wright, J. R. (2003). *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28, 528-537.
- Martin, S. L., Moffitt, K. L., McDowell, A., Greenan, C., Bright-Thomas, R. J., Jones, A. M., Webb, A. K. & Elborn, J. S. (2010). Association of airway cathepsin B and S with inflammation in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 45, 860-868.
- Martin, S. L., Downey, D., Bilton, D., Keogan, M. T., Edgar, J. & Elborn, J. S. (2006). Safety and efficacy of recombinant alpha(1)-antitrypsin therapy in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 41, 177-183.
- Mason, R. J. & Voelker, D. R. (1998). Regulatory mechanisms of surfactant secretion. *Biochim Biophys Acta* 1408, 226-240.
- Matel, J. L. & Milla, C. E. (2009). Nutrition in cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med* 30, 579-586.

- Matsumoto, F., Saitoh, S.-I., Fukui, R., Kobayashi, T., Tanimura, N., Konno, K., Kusumoto, Y., Akashi-Takamura, S. & Miyake, K. (2008). Cathepsins are required for Toll-like receptor 9 responses. *Biochem Biophys Res Commun* 367, 693-699.
- May, T. B., Shinabarger, D., Maharaj, R., Kato, J., Chu, L., DeVault, J. D., Roychoudhury, S., Zielinski, N. A., Berry, A. & Rothmel, R. K. (1991). Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Rev* 4, 191-206.
- McAllister, F., Henry, A., Kreindler, J. L., Dubin, P. J., Ulrich, L., Steele, C., Finder, J. D., Pilewski, J. M., Carreno, B. M., et coll. (2005). Role of IL-17A, IL-17F, and the IL-17 receptor in regulating growth-related oncogene- α and granulocyte colony-stimulating factor in bronchial epithelium: implications for airway inflammation in cystic fibrosis. *J Immunol* 175, 404-412.
- McCormack, F. X. (1998). Structure, processing and properties of surfactant protein A. *Biochim Biophys Acta* 1408, 109-131.
- McCormack, F. X., Calvert, H. M., Watson, P. A., Smith, D. L., Mason, R. J. & Voelker, D. R. (1994a). The structure and function of surfactant protein A. Hydroxyproline- and carbohydrate-deficient mutant proteins. *J Biol Chem* 269, 5833-5841.
- McCormack, F. X., Kuroki, Y., Stewart, J. J., Mason, R. J. & Voelker, D. R. (1994b). Surfactant protein A amino acids Glu195 and Arg197 are essential for receptor binding, phospholipid aggregation, regulation of secretion, and the facilitated uptake of phospholipid by type II cells. *J Biol Chem* 269, 29801-29807.
- McCormack, F. X., Pattanajitvilai, S., Stewart, J., Possmayer, F., Inchley, K. & Voelker, D. R. (1997a). The Cys6 intermolecular disulfide bond and the collagen-like region of rat SP-A play critical roles in interactions with alveolar type II cells and surfactant lipids. *J Biol Chem* 272, 27971-27979.
- McCormack, F. X., Festa, A. L., Andrews, R. P., Linke, M. & Walzer, P. D. (1997b). The carbohydrate recognition domain of surfactant protein A mediates binding to the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *Biochemistry* 36, 8092-8099.
- McCormack, F. X., Stewart, J., Voelker, D. R. & Damodarasamy, M. (1997c). Alanine mutagenesis of surfactant protein A reveals that lipid binding and pH-dependent liposome aggregation are mediated by the carbohydrate recognition domain. *Biochemistry* 36, 13963-13971.
- McCormack, F. X., Damodarasamy, M. & Elhalwagi, B. M. (1999). Deletion mapping of N-terminal domains of surfactant protein A. The N-terminal segment is required for phospholipid aggregation and specific inhibition of surfactant secretion. *J Biol Chem* 274, 3173-3181.
- McCormack, F. X. & Whitsett, J. A. (2002). The pulmonary collectins, SP-A and SP-D, orchestrate innate immunity in the lung. *J Clin Invest* 109, 707-712.
- McGrath, M. E. (1999). The lysosomal cysteine proteases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28, 181-204.
- McGrath, M. E., Eakin, A. E., Engel, J. C., McKerrow, J. H., Craik, C. S. & Fletterick, R. J. (1995). The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. *J Mol Biol* 247, 251-259.
- McLean, L. R., Lewis, J. E., Hagaman, K. A., Owen, T. J. & Jackson, R. L. (1993). Amphipathic α -helical peptides based on surfactant apoprotein SP-A. *Biochim Biophys Acta* 1166, 31-38.

- McNeely, T. B. & Coonrod, J. D. (1993). Comparison of the opsonic activity of human surfactant protein A for *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* with rabbit and human macrophages. *J Infect Dis* 167, 91-97.
- McNeely, T. B. & Coonrod, J. D. (1994). Aggregation and opsonization of type A but not type B *Hemophilus influenzae* by surfactant protein A. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11, 114-122.
- McPhail, G. L., Acton, J. D., Fenchel, M. C., Amin, R. S. & Seid, M. (2008). Improvements in lung function outcomes in children with cystic fibrosis are associated with better nutrition, fewer chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections, and dornase alfa use. *J Pediatr* 153, 752-757.
- McQueney, M. S., Amegadzie, B. Y., D'Alessio, K., Hanning, C. R., McLaughlin, M. M., McNulty, D., Carr, S. A., Ijames, C., Kurdyla, J. & Jones, C. S. (1997). Autocatalytic activation of human cathepsin K. *J Biol Chem* 272, 13955-13960.
- Mendelson, C. R. & Condon, J. C. (2005). New insights into the molecular endocrinology of parturition. *J Steroid Biochem Mol Biol* 93, 113-119.
- Merritt, T. A., Cochrane, C. G., Holcomb, K., Bohl, B., Hallman, M., Strayer, D., Edwards, D. K., 3rd & Gluck, L. (1983). Elastase and alpha 1-proteinase inhibitor activity in tracheal aspirates during respiratory distress syndrome. Role of inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *J Clin Invest* 72, 656-666.
- Meyboom, A., Maretzki, D., Stevens, P. A. & Hofmann, K. P. (1999). Interaction of pulmonary surfactant protein A with phospholipid liposomes: a kinetic study on head group and fatty acid specificity. *Biochim Biophys Acta* 1441, 23-35.
- Michallet, M.-C., Saltel, F., Flacher, M., Revillard, J.-P. & Genestier, L. (2004). Cathepsin-dependent apoptosis triggered by supraoptimal activation of T lymphocytes: a possible mechanism of high dose tolerance. *J Immunol* 172, 5405-5414.
- Mingarro, I., Lukovic, D., Vilar, M. & Pérez-Gil, J. (2008). Synthetic pulmonary surfactant preparations: new developments and future trends. *Curr Med Chem* 15, 393-403.
- Mohamed, M. M. & Sloane, B. F. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 764-775.
- Molina, F., Bouanani, M., Pau, B. & Granier, C. (1996). Characterization of the type-1 repeat from thyroglobulin, a cysteine-rich module found in proteins from different families. *Eur J Biochem* 240, 125-133.
- Moreau, T., Gutman, N., el Moujahed, A., Esnard, F. & Gauthier, F. (1986). Relationship between the cysteine-proteinase-inhibitory function of rat T kininogen and the release of immunoreactive kinin upon trypsin treatment. *Eur J Biochem* 159, 341-346.
- Moreau, T., Baranger, K., Dadé, S., Dallet-Choisy, S., Guyot, N. & Zani, M.-L. (2008). Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family. *Biochimie* 90, 284-295.
- Morral, N., Bertranpetit, J., Estivill, X., Nunes, V., Casals, T., Giménez, J., Reis, A., Varon-Mateeva, R., Macek, M., Jr & Kalaydjieva, L. (1994). The origin of the major cystic fibrosis mutation (delta F508) in European populations. *Nat Genet* 7, 169-175.

- Muhlebach, M. S., Stewart, P. W., Leigh, M. W. & Noah, T. L. (1999). Quantitation of inflammatory responses to bacteria in young cystic fibrosis and control patients. *Am J Respir Crit Care Med* 160, 186-191.
- Müller-Esterl, W. (1987). Novel functions of the kininogens. *Semin Thromb Hemost* 13, 115-126.
- Murakami, S., Iwaki, D., Mitsuzawa, H., Sano, H., Takahashi, H., Voelker, D. R., Akino, T. & Kuroki, Y. (2002). Surfactant protein A inhibits peptidoglycan-induced tumor necrosis factor- α secretion in U937 cells and alveolar macrophages by direct interaction with toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 277, 6830-6837.
- Murray, S., Charbeneau, J., Marshall, B. C. & LiPuma, J. J. (2008). Impact of burkholderia infection on lung transplantation in cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 178, 363-371.
- Musil, D., Zucic, D., Turk, D., Engh, R. A., Mayr, I., Huber, R., Popovic, T., Turk, V., Towatari, T. & Katunuma, N. (1991). The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J* 10, 2321-2330.
- Nägler, D. K., Storer, A. C., Portaro, F. C., Carmona, E., Juliano, L. & Ménard, R. (1997). Major increase in endopeptidase activity of human cathepsin B upon removal of occluding loop contacts. *Biochemistry* 36, 12608-12615.
- Nägler, D. K., Zhang, R., Tam, W., Sulea, T., Purisima, E. O. & Ménard, R. (1999). Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochemistry* 38, 12648-12654.
- Nakagawa, T., Roth, W., Wong, P., Nelson, A., Farr, A., Deussing, J., Villadangos, J. A., Ploegh, H., Peters, C. & Rudensky, A. Y. (1998). Cathepsin L: critical role in I α degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science* 280, 450-453.
- Nakagawa, T. Y., Brissette, W. H., Lira, P. D., Griffiths, R. J., Petrushova, N., Stock, J., McNeish, J. D., Eastman, S. E., Howard, E. D., et coll. (1999). Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* 10, 207-217.
- Nakanishi, H., Shindou, H., Hishikawa, D., Harayama, T., Ogasawara, R., Suwabe, A., Taguchi, R. & Shimizu, T. (2006). Cloning and characterization of mouse lung-type acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1). Expression in alveolar type II cells and possible involvement in surfactant production. *J Biol Chem* 281, 20140-20147.
- Naudin, C., Joulin-Giet, A., Couetdic, G., Plésiat, P., Szymanska, A., Gorna, E., Gauthier, F., Kasprzykowski, F., Lecaille, F. & Lalmanach, G. (2011). Human Cysteine Cathepsins Are Not Reliable Markers of Infection by *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. *PLoS ONE* 6, e25577 (S. Wölfl, Ed.).
- Nguyen, Q., Mort, J. S. & Roughley, P. J. (1990). Cartilage proteoglycan aggregate is degraded more extensively by cathepsin L than by cathepsin B. *Biochem J* 266, 569-573.
- Nguyen, Q., Liu, J., Roughley, P. J. & Mort, J. S. (1991). Link protein as a monitor in situ of endogenous proteolysis in adult human articular cartilage. *Biochem J* 278 (Pt 1), 143-147.
- Noah, T. L., Murphy, P. C., Alink, J. J., Leigh, M. W., Hull, W. M., Stahlman, M. T. & Whitsett, J. A. (2003). Bronchoalveolar lavage fluid surfactant protein-A and surfactant protein-D are inversely related to inflammation in early cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 168, 685-691.

- Nogee, L. M., Wert, S. E., Proffitt, S. A., Hull, W. M. & Whitsett, J. A. (2000). Allelic heterogeneity in hereditary surfactant protein B (SP-B) deficiency. *Am J Respir Crit Care Med* 161, 973-981.
- Nogee, L. M., Dunbar, A. E., 3rd, Wert, S. E., Askin, F., Hamvas, A. & Whitsett, J. A. (2001). A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N Engl J Med* 344, 573-579.
- Novinec, M., Grass, R. N., Stark, W. J., Turk, V., Baici, A. & Lenarcic, B. (2007). Interaction between human cathepsins K, L, and S and elastins: mechanism of elastinolysis and inhibition by macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* 282, 7893-7902.
- Ohashi, K., Naruto, M., Nakaki, T. & Sano, E. (2003). Identification of interleukin-8 converting enzyme as cathepsin L. *Biochim Biophys Acta* 1649, 30-39.
- Okamura-Oho, Y., Zhang, S., Callahan, J. W., Murata, M., Oshima, A. & Suzuki, Y. (1997). Maturation and degradation of beta-galactosidase in the post-Golgi compartment are regulated by cathepsin B and a non-cysteine protease. *FEBS Lett* 419, 231-234.
- Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F. & Blázquez, J. (2000). High frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis lung infection. *Science* 288, 1251-1254.
- Oörni, K., Sneek, M., Brömme, D., Pentikäinen, M. O., Lindstedt, K. A., Mäyränpää, M., Aitio, H. & Kovanen, P. T. (2004). Cysteine protease cathepsin F is expressed in human atherosclerotic lesions, is secreted by cultured macrophages, and modifies low density lipoprotein particles in vitro. *J Biol Chem* 279, 34776-34784.
- Orgeig, S., Bernhard, W., Biswas, S. C., Daniels, C. B., Hall, S. B., Hetz, S. K., Lang, C. J., Maina, J. N., Panda, A. K., et coll. (2007). The anatomy, physics, and physiology of gas exchange surfaces: is there a universal function for pulmonary surfactant in animal respiratory structures? *Integr Comp Biol* 47, 610-627.
- Overall, C. M. & Kleifeld, O. (2006). Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 6, 227-239.
- Palaniyar, N., Ridsdale, R. A., Holterman, C. E., Inchley, K., Possmayer, F. & Harauz, G. (1998). Structural changes of surfactant protein A induced by cations reorient the protein on lipid bilayers. *J Struct Biol* 122, 297-310.
- Palaniyar, N., McCormack, F. X., Possmayer, F. & Harauz, G. (2000). Three-dimensional structure of rat surfactant protein A trimers in association with phospholipid monolayers. *Biochemistry* 39, 6310-6316.
- Palaniyar, N., Nadesalingam, J., Clark, H., Shih, M. J., Dodds, A. W. & Reid, K. B. M. (2004). Nucleic acid is a novel ligand for innate, immune pattern recognition collectins surfactant proteins A and D and mannose-binding lectin. *J Biol Chem* 279, 32728-32736.
- Palermo, C. & Joyce, J. A. (2008). Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends Pharmacol Sci* 29, 22-28.
- Palmer, J. T., Rasnick, D., Klaus, J. L. & Brömme, D. (1995). Vinyl sulfones as mechanism-based cysteine protease inhibitors. *J Med Chem* 38, 3193-3196.
- Park, B., Brinkmann, M. M., Spooner, E., Lee, C. C., Kim, Y.-M. & Ploegh, H. L. (2008). Proteolytic cleavage in an endolysosomal compartment is required for activation of Toll-like receptor 9. *Nat Immunol* 9, 1407-1414.

- Pasula, R., Downing, J. F., Wright, J. R., Kachel, D. L., Davis, T. E., Jr & Martin, W. J., 2nd. (1997). Surfactant protein A (SP-A) mediates attachment of *Mycobacterium tuberculosis* to murine alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17, 209-217.
- Pattanaajitvilai, S., Kuroki, Y., Tsunazawa, W., McCormack, F. X. & Voelker, D. R. (1998). Mutational analysis of Arg197 of rat surfactant protein A. His197 creates specific lipid uptake defects. *J Biol Chem* 273, 5702-5707.
- Pattle, R. E. (1955). Properties, function and origin of the alveolar lining layer. *Nature* 175, 1125-1126.
- Perdereau, C., Godat, E., Maurel, M.-C., Hazouard, E., Diot, E. & Lalmanach, G. (2006). Cysteine cathepsins in human silicotic bronchoalveolar lavage fluids. *Biochim Biophys Acta* 1762, 351-356.
- Pérez-Gil, J. (2008). Structure of pulmonary surfactant membranes and films: the role of proteins and lipid-protein interactions. *Biochim Biophys Acta* 1778, 1676-1695.
- Pham, C. T. & Ley, T. J. (1999). Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 8627-8632.
- Phizackerley, P. J., Town, M. H. & Newman, G. E. (1979). Hydrophobic proteins of lamellated osmiophilic bodies isolated from pig lung. *Biochem J* 183, 731-736.
- Piboonpocanun, S., Chiba, H., Mitsuzawa, H., Martin, W., Murphy, R. C., Harbeck, R. J. & Voelker, D. R. (2005). Surfactant protein A binds *Mycoplasma pneumoniae* with high affinity and attenuates its growth by recognition of disaturated phosphatidylglycerols. *J Biol Chem* 280, 9-17.
- Podobnik, M., Kuhelj, R., Turk, V. & Turk, D. (1997). Crystal structure of the wild-type human procathepsin B at 2.5 Å resolution reveals the native active site of a papain-like cysteine protease zymogen. *J Mol Biol* 271, 774-788.
- Popovic, T., Cimerman, N., Dolenc, I., Ritonja, A. & Brzin, J. (1999). Cathepsin L is capable of truncating cystatin C of 11 N-terminal amino acids. *FEBS Lett* 455, 92-96.
- Postle, A. D., Mander, A., Reid, K. B., Wang, J. Y., Wright, S. M., Moustaki, M. & Warner, J. O. (1999). Deficient hydrophilic lung surfactant proteins A and D with normal surfactant phospholipid molecular species in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20, 90-98.
- Primakoff, P. & Myles, D. G. (2000). The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet* 16, 83-87.
- Pukhalsky, A. L., Shmarina, G. V., Kapranov, N. I., Kokarovtseva, S. N., Pukhalskaya, D. & Kashirskaja, N. J. (2004). Anti-inflammatory and immunomodulating effects of clarithromycin in patients with cystic fibrosis lung disease. *Mediators Inflamm* 13, 111-117.
- Punturieri, A., Filippov, S., Allen, E., Caras, I., Murray, R., Reddy, V. & Weiss, S. J. (2000). Regulation of elastolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages. *J Exp Med* 192, 789-799.
- Quesada, V., Ordóñez, G. R., Sánchez, L. M., Puente, X. S. & López-Otín, C. (2009). The Degradome database: mammalian proteases and diseases of proteolysis. *Nucleic Acids Res* 37, D239-243.
- Ramsey, B. W. (1996). Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* 335, 179-188.

- Ratjen, F., Comes, G., Paul, K., Posselt, H. G., Wagner, T. O. & Harms, K. (2001a). Effect of continuous antistaphylococcal therapy on the rate of *P. aeruginosa* acquisition in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 31, 13-16.
- Ratjen, F., Döring, G. & Nikolaizik, W. H. (2001b). Effect of inhaled tobramycin on early *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in patients with cystic fibrosis. *Lancet* 358, 983-984.
- Ratjen, F. & Döring, G. (2003). Cystic fibrosis. *Lancet* 361, 681-689.
- Rawlings, N. D. & Barrett, A. J. (1994). Families of cysteine peptidases. *Meth Enzymol* 244, 461-486.
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P. & Barrett, A. J. (2004). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 32, D160-164.
- Rawlings, N. D., Barrett, A. J. & Bateman, A. (2010). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 38, D227-233.
- Reddy, V. Y., Zhang, Q. Y. & Weiss, S. J. (1995). Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 3849-3853.
- Reeck, G. R., de Haën, C., Teller, D. C., Doolittle, R. F., Fitch, W. M., Dickerson, R. E., Chambon, P., McLachlan, A. D., Margoliash, E. & Jukes, T. H. (1987). "Homology" in proteins and nucleic acids: a terminology muddle and a way out of it. *Cell* 50, 667.
- Rich, D. H., Brown, M. A. & Barrett, A. J. (1986). Purification of cathepsin B by a new form of affinity chromatography. *Biochem J* 235, 731-734.
- Ridsdale, R. A., Palaniyar, N., Holterman, C. E., Inchley, K., Possmayer, F. & Harauz, G. (1999). Cation-mediated conformational variants of surfactant protein A. *Biochim Biophys Acta* 1453, 23-34.
- Riese, R. J., Wolf, P. R., Brömme, D., Natkin, L. R., Villadangos, J. A., Ploegh, H. L. & Chapman, H. A. (1996). Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* 4, 357-366.
- Riese, R. J., Mitchell, R. N., Villadangos, J. A., Shi, G. P., Palmer, J. T., Karp, E. R., De Sanctis, G. T., Ploegh, H. L. & Chapman, H. A. (1998). Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *J Clin Invest* 101, 2351-2363.
- Riordan, J. R., Rommens, J. M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N. & Chou, J. L. (1989). Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245, 1066-1073.
- Robertson, B., Curstedt, T., Johansson, J., Jornvall, H., Kobayashi, T. (1990). Structural and functional characterization of porcine surfactant isolated by liquid-gel chromatography. *Prog Resp Res* 25, 237-246.
- Rodríguez, A., Webster, P., Ortego, J. & Andrews, N. W. (1997). Lysosomes behave as Ca²⁺-regulated exocytic vesicles in fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol* 137, 93-104.
- Rogan, M. P., Taggart, C. C., Greene, C. M., Murphy, P. G., O'Neill, S. J. & McElvaney, N. G. (2004). Loss of microbicidal activity and increased formation of biofilm due to decreased lactoferrin activity in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis* 190, 1245-1253.
- Romero, R., Mazor, M., Wu, Y. K., Sirtori, M., Oyarzun, E., Mitchell, M. D. & Hobbins, J. C. (1988). Infection in the pathogenesis of preterm labor. *Semin Perinatol* 12, 262-279.

Rooney, S. A. (2001). Regulation of surfactant secretion. *Comp Biochem Physiol, Part A Mol Integr Physiol* 129, 233-243.

Ross, G. F., Notter, R. H., Meuth, J. & Whitsett, J. A. (1986). Phospholipid binding and biophysical activity of pulmonary surfactant-associated protein (SAP)-35 and its non-collagenous COOH-terminal domains. *J Biol Chem* 261, 14283-14291.

Ross, G. F., Sawyer, J., O'Connor, T. & Whitsett, J. A. (1991). Intermolecular cross-links mediate aggregation of phospholipid vesicles by pulmonary surfactant protein SP-A. *Biochemistry* 30, 858-865.

Roth, W., Deussing, J., Botchkarev, V. A., Pauly-Evers, M., Saftig, P., Hafner, A., Schmidt, P., Schmahl, W., Scherer, J., et coll. (2000). Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J* 14, 2075-2086.

Rowan, A. D., Mason, P., Mach, L. & Mort, J. S. (1992). Rat procathepsin B. Proteolytic processing to the mature form in vitro. *J Biol Chem* 267, 15993-15999.

Rozhin, J., Sameni, M., Ziegler, G. & Sloane, B. F. (1994). Pericellular pH affects distribution and secretion of cathepsin B in malignant cells. *Cancer Res* 54, 6517-6525.

Ruano, M. L., Miguel, E., Perez-Gil, J. & Casals, C. (1996). Comparison of lipid aggregation and self-aggregation activities of pulmonary surfactant-associated protein A. *Biochem J* 313 (Pt 2), 683-689.

Ruano, M. L., Nag, K., Worthman, L. A., Casals, C., Pérez-Gil, J. & Keough, K. M. (1998). Differential partitioning of pulmonary surfactant protein SP-A into regions of monolayers of dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylcholine/dipalmitoylphosphatidylglycerol. *Biophys J* 74, 1101-1109.

Ruano, M. L., García-Verdugo, I., Miguel, E., Pérez-Gil, J. & Casals, C. (2000). Self-aggregation of surfactant protein A. *Biochemistry* 39, 6529-6537.

Rubenstein, R. C. & Zeitlin, P. L. (1998). A pilot clinical trial of oral sodium 4-phenylbutyrate (Buphenyl) in deltaF508-homozygous cystic fibrosis patients: partial restoration of nasal epithelial CFTR function. *Am J Respir Crit Care Med* 157, 484-490.

Rubio, F., Cooley, J., Accurso, F. J. & Remold-O'Donnell, E. (2004). Linkage of neutrophil serine proteases and decreased surfactant protein-A (SP-A) levels in inflammatory lung disease. *Thorax* 59, 318-323.

Rzychon, M., Chmiel, D. & Stec-Niemczyk, J. (2004). Modes of inhibition of cysteine proteases. *Acta Biochim Pol* 51, 861-873.

Sahu, S. & Lynn, W. S. (1978). Lipid composition of sputum from patients with asthma and patients with cystic fibrosis. *Inflammation* 3, 27-36.

Saiman, L., Marshall, B. C., Mayer-Hamblett, N., Burns, J. L., Quittner, A. L., Cibene, D. A., Coquillet, S., Fieberg, A. Y., Accurso, F. J. & Campbell, P. W., 3rd. (2003). Azithromycin in patients with cystic fibrosis chronically infected with *Pseudomonas aeruginosa*: a randomized controlled trial. *JAMA* 290, 1749-1756.

Salvesen, G., Parkes, C., Abrahamson, M., Grubb, A. & Barrett, A. J. (1986). Human low-Mr kininogen contains three copies of a cystatin sequence that are divergent in structure and in inhibitory activity for cysteine proteinases. *Biochem J* 234, 429-434.

- Sánchez-Barbero, F., Strassner, J., García-Cañero, R., Steinhilber, W. & Casals, C. (2005). Role of the degree of oligomerization in the structure and function of human surfactant protein A. *J Biol Chem* 280, 7659-7670.
- Sano, H., Sohma, H., Muta, T., Nomura, S., Voelker, D. R. & Kuroki, Y. (1999). Pulmonary surfactant protein A modulates the cellular response to smooth and rough lipopolysaccharides by interaction with CD14. *J Immunol* 163, 387-395.
- Sano, H. & Kuroki, Y. (2005). The lung collectins, SP-A and SP-D, modulate pulmonary innate immunity. *Mol Immunol* 42, 279-287.
- Sato, M., Sano, H., Iwaki, D., Kudo, K., Konishi, M., Takahashi, H., Takahashi, T., Imaizumi, H., Asai, Y. & Kuroki, Y. (2003). Direct binding of Toll-like receptor 2 to zymosan, and zymosan-induced NF-kappa B activation and TNF-alpha secretion are down-regulated by lung collectin surfactant protein A. *J Immunol* 171, 417-425.
- Schagat, T. L., Wofford, J. A. & Wright, J. R. (2001). Surfactant protein A enhances alveolar macrophage phagocytosis of apoptotic neutrophils. *J Immunol* 166, 2727-2733.
- Schechter, I. & Berger, A. (1967). On the size of the active site in proteases. I. Papain. *Biochem Biophys Res Commun* 27, 157-162.
- Schick, C., Pemberton, P. A., Shi, G. P., Kamachi, Y., Cataltepe, S., Bartuski, A. J., Gornstein, E. R., Brömme, D., Chapman, H. A. & Silverman, G. A. (1998). Cross-class inhibition of the cysteine proteinases cathepsins K, L, and S by the serpin squamous cell carcinoma antigen 1: a kinetic analysis. *Biochemistry* 37, 5258-5266.
- Schlagenhauff, B., Klessen, C., Teichmann-Dörr, S., Breuninger, H. & Rassner, G. (1992). Demonstration of proteases in basal cell carcinomas. A histochemical study using amino acid-4-methoxy-2-naphthylamides as chromogenic substrates. *Cancer* 70, 1133-1140.
- Schmitt-Grohé, S. & Zielen, S. (2005). Leukotriene receptor antagonists in children with cystic fibrosis lung disease: anti-inflammatory and clinical effects. *Paediatr Drugs* 7, 353-363.
- Schmitz, G. & Müller, G. (1991). Structure and function of lamellar bodies, lipid-protein complexes involved in storage and secretion of cellular lipids. *J Lipid Res* 32, 1539-1570.
- Schwiebert, E. M., Benos, D. J., Egan, M. E., Stutts, M. J. & Guggino, W. B. (1999). CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. *Physiol Rev* 79, S145-166.
- Seibert, F. S., Loo, T. W., Clarke, D. M. & Riordan, J. R. (1997). Cystic fibrosis: channel, catalytic, and folding properties of the CFTR protein. *J Bioenerg Biomembr* 29, 429-442.
- Selent, J., Kaleta, J., Li, Z., Lalmanach, G. & Brömme, D. (2007). Selective inhibition of the collagenase activity of cathepsin K. *J Biol Chem* 282, 16492-16501.
- Serveau-Avesque, C., Martino, M. F.-D., Hervé-Grépinet, V., Hazouard, E., Gauthier, F., Diot, E. & Lalmanach, G. (2006). Active cathepsins B, H, K, L and S in human inflammatory bronchoalveolar lavage fluids. *Biol Cell* 98, 15-22.
- Seymour, J. F. & Presneill, J. J. (2002). Pulmonary alveolar proteinosis: progress in the first 44 years. *Am J Respir Crit Care Med* 166, 215-235.
- Shang, F., Rynkiewicz, M. J., McCormack, F. X., Wu, H., Cafarella, T. M., Head, J. F. & Seaton, B. A. (2011). Crystallographic complexes of surfactant protein A and carbohydrates reveal ligand-induced conformational change. *J Biol Chem* 286, 757-765.

- Shapiro, S. D., Campbell, E. J., Kobayashi, D. K. & Welgus, H. G. (1991). Dexamethasone selectively modulates basal and lipopolysaccharide-induced metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase production by human alveolar macrophages. *J Immunol* 146, 2724-2729.
- Shaw, E. (1990). Cysteinyl proteinases and their selective inactivation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 63, 271-347.
- Shi, G. P., Munger, J. S., Meara, J. P., Rich, D. H. & Chapman, H. A. (1992). Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease. *J Biol Chem* 267, 7258-7262.
- Shi, G. P., Webb, A. C., Foster, K. E., Knoll, J. H., Lemere, C. A., Munger, J. S. & Chapman, H. A. (1994). Human cathepsin S: chromosomal localization, gene structure, and tissue distribution. *J Biol Chem* 269, 11530-11536.
- Shi, G. P., Villadangos, J. A., Dranoff, G., Small, C., Gu, L., Haley, K. J., Riese, R., Ploegh, H. L. & Chapman, H. A. (1999a). Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* 10, 197-206.
- Shi, G. P., Sukhova, G. K., Grubb, A., Ducharme, A., Rhode, L. H., Lee, R. T., Ridker, P. M., Libby, P. & Chapman, H. A. (1999b). Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms. *J Clin Invest* 104, 1191-1197.
- Short, D. B., Trotter, K. W., Reczek, D., Kreda, S. M., Bretscher, A., Boucher, R. C., Stutts, M. J. & Milgram, S. L. (1998). An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J Biol Chem* 273, 19797-19801.
- Shulenin, S., Noguee, L. M., Annilo, T., Wert, S. E., Whitsett, J. A. & Dean, M. (2004). ABCA3 gene mutations in newborns with fatal surfactant deficiency. *N Engl J Med* 350, 1296-1303.
- Sidobre, S., Nigou, J., Puzo, G. & Rivière, M. (2000). Lipoglycans are putative ligands for the human pulmonary surfactant protein A attachment to mycobacteria. Critical role of the lipids for lectin-carbohydrate recognition. *J Biol Chem* 275, 2415-2422.
- Sivaraman, J., Nägler, D. K., Zhang, R., Ménard, R. & Cygler, M. (2000). Crystal structure of human procathepsin X: a cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine. *J Mol Biol* 295, 939-951.
- Smith, V. V., Schäppi, M. G., Bisset, W. M., Kiparissi, F., Jaffe, A., Milla, P. J. & Lindley, K. J. (2009). Lymphocytic leiomyositis and myenteric ganglionitis are intrinsic features of cystic fibrosis: studies in distal intestinal obstruction syndrome and meconium ileus. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 49, 42-51.
- Smyth, A. (2006). Update on treatment of pulmonary exacerbations in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* 12, 440-444.
- Sohma, H., Hattori, A., Kuroki, Y. & Akino, T. (1993). Calcium and dithiothreitol dependent conformational changes in beta-sheet structure of collagenase resistant fragment of human surfactant protein A. *Biochem Mol Biol Int* 30, 329-336.
- Sokol, J. P. & Schiemann, W. P. (2004). Cystatin C antagonizes transforming growth factor beta signaling in normal and cancer cells. *Mol Cancer Res* 2, 183-195.
- Somoza, J. R., Palmer, J. T. & Ho, J. D. (2002). The crystal structure of human cathepsin F and its implications for the development of novel immunomodulators. *J Mol Biol* 322, 559-568.

- Stinchcombe, J. C. & Griffiths, G. M. (1999). Regulated secretion from hemopoietic cells. *J Cell Biol* 147, 1-6.
- Stoka, V., Lenarcic, B., Cazzulo, J. J. & Turk, V. (1999). Cathepsin S and cruzipain are inhibited by equistatin from *Actinia equina*. *Biol Chem* 380, 589-592.
- Stoka, V., Turk, B., Schendel, S. L., Kim, T. H., Cirman, T., Snipas, S. J., Ellerby, L. M., Bredesen, D., Freeze, H., et coll. (2001). Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not procaspases, is the most likely route. *J Biol Chem* 276, 3149-3157.
- Storer, A. C. & Ménard, R. (1994). Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Meth Enzymol* 244, 486-500.
- Strieter, R. M. (2002). Interleukin-8: a very important chemokine of the human airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283, L688-689.
- Stubbs, M. T., Laber, B., Bode, W., Huber, R., Jerala, R., Lenarcic, B. & Turk, V. (1990). The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. *EMBO J* 9, 1939-1947.
- Sukhova, G. K., Shi, G. P., Simon, D. I., Chapman, H. A. & Libby, P. (1998). Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest* 102, 576-583.
- Suzuki, Y., Fujita, Y. & Kogishi, K. (1989). Reconstitution of tubular myelin from synthetic lipids and proteins associated with pig pulmonary surfactant. *Am Rev Respir Dis* 140, 75-81.
- Taggart, C. C., Lowe, G. J., Greene, C. M., Mulgrew, A. T., O'Neill, S. J., Levine, R. L. & McElvaney, N. G. (2001). Cathepsin B, L, and S cleave and inactivate secretory leucoprotease inhibitor. *J Biol Chem* 276, 33345-33352.
- Taggart, C. C., Greene, C. M., Smith, S. G., Levine, R. L., McCray, P. B., Jr, O'Neill, S. & McElvaney, N. G. (2003). Inactivation of human beta-defensins 2 and 3 by elastolytic cathepsins. *J Immunol* 171, 931-937.
- Takizawa, H., Desaki, M., Ohtoshi, T., Kawasaki, S., Kohyama, T., Sato, M., Tanaka, M., Kasama, T., Kobayashi, K., et coll. (1997). Erythromycin modulates IL-8 expression in normal and inflamed human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 156, 266-271.
- Taleb, S. & Clément, K. (2007). Emerging role of cathepsin S in obesity and its associated diseases. *Clin Chem Lab Med* 45, 328-332.
- Taleb, S., Lacasa, D., Bastard, J.-P., Poitou, C., Canello, R., Pelloux, V., Viguerie, N., Benis, A., Zucker, J.-D., et coll. (2005). Cathepsin S, a novel biomarker of adiposity: relevance to atherogenesis. *FASEB J* 19, 1540-1542.
- Tamaoki, J., Takeyama, K., Tagaya, E. & Konno, K. (1995). Effect of clarithromycin on sputum production and its rheological properties in chronic respiratory tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 39, 1688-1690.
- Tamaoki, J., Kadota, J. & Takizawa, H. (2004). Clinical implications of the immunomodulatory effects of macrolides. *Am J Med* 117 Suppl 9A, 5S-11S.

Tate, S., MacGregor, G., Davis, M., Innes, J. A. & Greening, A. P. (2002). Airways in cystic fibrosis are acidified: detection by exhaled breath condensate. *Thorax* 57, 926-929.

Taylor, C. J. & Hardcastle, J. (2005). Gut Disease: Clinical Manifestations, Pathophysiology, Current and New Treatments. In *Progress in Respiratory Research*, pp. 232-241. Edited by A. Bush, E. W. F. W. Alton, J. C. Davies, U. Griesenbach & A. Jaffe. Basel: KARGER.

Taylor, M. A., Baker, K. C., Briggs, G. S., Connerton, I. F., Cummings, N. J., Pratt, K. A., Revell, D. F., Freedman, R. B. & Goodenough, P. W. (1995). Recombinant pro-regions from papain and papaya proteinase IV-are selective high affinity inhibitors of the mature papaya enzymes. *Protein Eng* 8, 59-62.

Tenner, A. J., Robinson, S. L., Borchelt, J. & Wright, J. R. (1989). Human pulmonary surfactant protein (SP-A), a protein structurally homologous to Clq, can enhance FcR- and CR1-mediated phagocytosis. *J Biol Chem* 264, 13923-13928.

Tezuka, K., Tezuka, Y., Maejima, A., Sato, T., Nemoto, K., Kamioka, H., Hakeda, Y. & Kumegawa, M. (1994). Molecular cloning of a possible cysteine proteinase predominantly expressed in osteoclasts. *J Biol Chem* 269, 1106-1109.

Thomas, A. Q., Lane, K., Phillips, J., 3rd, Prince, M., Markin, C., Speer, M., Schwartz, D. A., Gaddipati, R., Marney, A., et coll. (2002). Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am J Respir Crit Care Med* 165, 1322-1328.

Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22, 4673-4680.

Thompson, S. K., Halbert, S. M., Bossard, M. J., Tomaszek, T. A., Levy, M. A., Zhao, B., Smith, W. W., Abdel-Meguid, S. S., Janson, C. A., et coll. (1997). Design of potent and selective human cathepsin K inhibitors that span the active site. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 14249-14254.

Tirouvanziam, R., Conrad, C. K., Bottiglieri, T., Herzenberg, L. A., Moss, R. B. & Herzenberg, L. A. (2006). High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 4628-4633.

Tolosa, E., Li, W., Yasuda, Y., Wienhold, W., Denzin, L. K., Lautwein, A., Driessen, C., Schnorrer, P., Weber, E., et coll. (2003). Cathepsin V is involved in the degradation of invariant chain in human thymus and is overexpressed in myasthenia gravis. *J Clin Invest* 112, 517-526.

Tomashefski, J. F., Jr. (2000). Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 21, 435-466.

Trabandt, A., Aicher, W. K., Gay, R. E., Sukhatme, V. P., Nilson-Hamilton, M., Hamilton, R. T., McGhee, J. R., Fassbender, H. G. & Gay, S. (1990). Expression of the collagenolytic and Ras-induced cysteine proteinase cathepsin L and proliferation-associated oncogenes in synovial cells of MRL/l mice and patients with rheumatoid arthritis. *Matrix* 10, 349-361.

Tschumperlin, D. J. & Margulies, S. S. (1998). Equibiaxial deformation-induced injury of alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol* 275, L1173-1183.

Turk, B., Turk, D. & Turk, V. (2000). Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta* 1477, 98-111.

- Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* 5, 785-799.
- Turk, D., Guncar, G., Podobnik, M. & Turk, B. (1998). Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol Chem* 379, 137-147.
- Turk, D., Janjić, V., Stern, I., Podobnik, M., Lamba, D., Dahl, S. W., Lauritzen, C., Pedersen, J., Turk, V. & Turk, B. (2001a). Structure of human dipeptidyl peptidase I (cathepsin C): exclusion domain added to an endopeptidase framework creates the machine for activation of granular serine proteases. *EMBO J* 20, 6570-6582.
- Turk, D. & Guncar, G. (2003). Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 59, 203-213.
- Turk, D., Turk, B. & Turk, V. (2003). Papain-like lysosomal cysteine proteases and their inhibitors: drug discovery targets? *Biochem Soc Symp* 15-30.
- Turk, V. & Bode, W. (1991). The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* 285, 213-219.
- Turk, V., Turk, B. & Turk, D. (2001b). Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J* 20, 4629-4633.
- Turk, V., Kos, J. & Turk, B. (2004). Cysteine cathepsins (proteases)--on the main stage of cancer? *Cancer Cell* 5, 409-410.
- Ueno, T., Linder, S., Na, C.-L., Rice, W. R., Johansson, J. & Weaver, T. E. (2004). Processing of pulmonary surfactant protein B by napsin and cathepsin H. *J Biol Chem* 279, 16178-16184.
- Ulevitch, R. J. & Tobias, P. S. (1995). Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 13, 437-457.
- Valerius, N. H., Koch, C. & Høiby, N. (1991). Prevention of chronic *Pseudomonas aeruginosa* colonisation in cystic fibrosis by early treatment. *Lancet* 338, 725-726.
- Van den Steen, P. E., Proost, P., Wuyts, A., Van Damme, J. & Opdenakker, G. (2000). Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* 96, 2673-2681.
- van de Wetering, J. K., van Golde, L. M. G. & Batenburg, J. J. (2004). Collectins: players of the innate immune system. *Eur J Biochem* 271, 1229-1249.
- Van Goor, F., Hadida, S., Grootenhuys, P. D. J., Burton, B., Cao, D., Neuberger, T., Turnbull, A., Singh, A., Joubran, J., et coll. (2009). Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. *Proc Natl Acad Sci USA* 106, 18825-18830.
- Van Iwaarden, J. F., Pikaar, J. C., Storm, J., Brouwer, E., Verhoef, J., Oosting, R. S., van Golde, L. M. & van Strijp, J. A. (1994). Binding of surfactant protein A to the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharides. *Biochem J* 303 (Pt 2), 407-411.
- van Iwaarden, J. F., van Strijp, J. A., Visser, H., Haagsman, H. P., Verhoef, J. & van Golde, L. M. (1992). Binding of surfactant protein A (SP-A) to herpes simplex virus type 1-infected cells is mediated by the carbohydrate moiety of SP-A. *J Biol Chem* 267, 25039-25043.

Vankeerberghen, A., Cuppens, H. & Cassiman, J.-J. (2002). The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros* 1, 13-29.

Varelogianni, G., Oliynyk, I., Roomans, G. M. & Johannesson, M. (2010). The effect of N-acetylcysteine on chloride efflux from airway epithelial cells. *Cell Biol Int* 34, 245-252.

Vasiljeva, O., Dolinar, M., Turk, V. & Turk, B. (2003). Recombinant human cathepsin H lacking the mini chain is an endopeptidase. *Biochemistry* 42, 13522-13528.

Vasiljeva, O., Dolinar, M., Pungercar, J. R., Turk, V. & Turk, B. (2005). Recombinant human procathepsin S is capable of autocatalytic processing at neutral pH in the presence of glycosaminoglycans. *FEBS Lett* 579, 1285-1290.

Vasiljeva, O., Reinheckel, T., Peters, C., Turk, D., Turk, V. & Turk, B. (2007). Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr Pharm Des* 13, 387-403.

Veeze, H. J., Sinaasappel, M., Bijman, J., Bouquet, J. & de Jonge, H. R. (1991). Ion transport abnormalities in rectal suction biopsies from children with cystic fibrosis. *Gastroenterology* 101, 398-403.

Veillard, F., Lecaille, F. & Lalmanach, G. (2008). Lung cysteine cathepsins: intruders or unorthodox contributors to the kallikrein-kinin system? *Int J Biochem Cell Biol* 40, 1079-1094.

Veldhuizen, R., Nag, K., Orgeig, S. & Possmayer, F. (1998). The role of lipids in pulmonary surfactant. *Biochim Biophys Acta* 1408, 90-108.

Veldhuizen, R. A., Hearn, S. A., Lewis, J. F. & Possmayer, F. (1994). Surface-area cycling of different surfactant preparations: SP-A and SP-B are essential for large-aggregate integrity. *Biochem J* 300 (Pt 2), 519-524.

Veldhuizen, R. & Possmayer, F. (2004). Phospholipid metabolism in lung surfactant. *Subcell Biochem* 37, 359-388.

Vernet, T., Tessier, D. C., Richardson, C., Laliberté, F., Khouri, H. E., Bell, A. W., Storer, A. C. & Thomas, D. Y. (1990). Secretion of functional papain precursor from insect cells. Requirement for N-glycosylation of the pro-region. *J Biol Chem* 265, 16661-16666.

Von Bredow, C., Birrer, P. & Griesse, M. (2001). Surfactant protein A and other bronchoalveolar lavage fluid proteins are altered in cystic fibrosis. *Eur Respir J* 17, 716-722.

Von Neergaard, K. (1929). Neue auffassungen uber einen grundbegriff der atemmechanik. Die retraktionskraft der lunge, abhangig von der oberflachenspannung in den alveolen. *Z Gesamt Exp Med* 66, 373-394.

Vorbroker, D. K., Profitt, S. A., Noguee, L. M. & Whitsett, J. A. (1995). Aberrant processing of surfactant protein C in hereditary SP-B deficiency. *Am J Physiol* 268, L647-656.

Voss, T., Eistetter, H., Schäfer, K. P. & Engel, J. (1988). Macromolecular organization of natural and recombinant lung surfactant protein SP 28-36. Structural homology with the complement factor C1q. *J Mol Biol* 201, 219-227.

Walsh, D. E., Greene, C. M., Carroll, T. P., Taggart, C. C., Gallagher, P. M., O'Neill, S. J. & McElvaney, N. G. (2001). Interleukin-8 up-regulation by neutrophil elastase is mediated by MyD88/IRAK/TRAF-6 in human bronchial epithelium. *J Biol Chem* 276, 35494-35499.

- Wang, B., Sun, J., Kitamoto, S., Yang, M., Grubb, A., Chapman, H. A., Kalluri, R. & Shi, G.-P. (2006). Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. *J Biol Chem* 281, 6020-6029.
- Wang, J. Y., Shieh, C. C., You, P. F., Lei, H. Y. & Reid, K. B. (1998). Inhibitory effect of pulmonary surfactant proteins A and D on allergen-induced lymphocyte proliferation and histamine release in children with asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 158, 510-518.
- Wang, J.-Y. & Reid, K. B. M. (2007). The immunoregulatory roles of lung surfactant collectins SP-A, and SP-D, in allergen-induced airway inflammation. *Immunobiology* 212, 417-425.
- Ware, L. B. & Matthay, M. A. (2000). The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342, 1334-1349.
- Weaver, L. T., Green, M. R., Nicholson, K., Mills, J., Heeley, M. E., Kuzemko, J. A., Austin, S., Gregory, G. A., Dux, A. E. & Davis, J. A. (1994). Prognosis in cystic fibrosis treated with continuous flucloxacillin from the neonatal period. *Arch Dis Child* 70, 84-89.
- Weaver, T. E. & Conkright, J. J. (2001). Function of surfactant proteins B and C. *Annu Rev Physiol* 63, 555-578.
- Weaver, T. E. & Whitsett, J. A. (1989). Processing of hydrophobic pulmonary surfactant protein B in rat type II cells. *Am J Physiol* 257, L100-108.
- Weaver, T. E., Na, C.-L. & Stahlman, M. (2002). Biogenesis of lamellar bodies, lysosome-related organelles involved in storage and secretion of pulmonary surfactant. *Semin Cell Dev Biol* 13, 263-270.
- Weikert, L. F., Edwards, K., Chroneos, Z. C., Hager, C., Hoffman, L. & Shepherd, V. L. (1997). SP-A enhances uptake of bacillus Calmette-Guérin by macrophages through a specific SP-A receptor. *Am J Physiol* 272, L989-995.
- Weikert, L. F., Lopez, J. P., Abdolrasulnia, R., Chroneos, Z. C. & Shepherd, V. L. (2000). Surfactant protein A enhances mycobacterial killing by rat macrophages through a nitric oxide-dependent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279, L216-223.
- Weis, W. I., Drickamer, K. & Hendrickson, W. A. (1992). Structure of a C-type mannose-binding protein complexed with an oligosaccharide. *Nature* 360, 127-134.
- Weis, W. I., Taylor, M. E. & Drickamer, K. (1998). The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev* 163, 19-34.
- Welss, T., Sun, J., Irving, J. A., Blum, R., Smith, A. I., Whisstock, J. C., Pike, R. N., von Mikecz, A., Ruzicka, T., et coll. (2003). Hurpin is a selective inhibitor of lysosomal cathepsin L and protects keratinocytes from ultraviolet-induced apoptosis. *Biochemistry* 42, 7381-7389.
- Wex, T., Wex, H. & Brömme, D. (1999). The human cathepsin F gene--a fusion product between an ancestral cathepsin and cystatin gene. *Biol Chem* 380, 1439-1442.
- Whitsett, J. A. & Weaver, T. E. (2002). Hydrophobic surfactant proteins in lung function and disease. *N Engl J Med* 347, 2141-2148.
- Wiesemann, H. G., Steinkamp, G., Ratjen, F., Bauernfeind, A., Przyklenk, B., Döring, G. & von der Hardt, H. (1998). Placebo-controlled, double-blind, randomized study of aerosolized tobramycin for early treatment of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 25, 88-92.

- Wilkins, R. J. & Hall, A. C. (1995). Control of matrix synthesis in isolated bovine chondrocytes by extracellular and intracellular pH. *J Cell Physiol* 164, 474-481.
- Wille, A., Heimbürg, A., Gerber, A., Reisenauer, A., Welte, T. & Bühling, F. (2002). Functional consequences of cathepsin L deficiency in human lung epithelial cells. *Biol Chem* 383, 1291-1296.
- Williams, A. S., Eynott, P. R., Leung, S.-Y., Nath, P., Jupp, R., De Sanctis, G. T., Resnick, R., Adcock, I. M. & Chung, K. F. (2009). Role of cathepsin S in ozone-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *Pulm Pharmacol Ther* 22, 27-32.
- Willstätter, R.B. & Bamann, E. (1929). Proteases in the gastric mucosa [Über die proteasen der magenschleimhaut]. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 180, 127-143.
- Wilmott, R. W. (1998). Making the diagnosis of cystic fibrosis. *J Pediatr* 132, 563-565.
- Wirtz, H. R. & Dobbs, L. G. (1990). Calcium mobilization and exocytosis after one mechanical stretch of lung epithelial cells. *Science* 250, 1266-1269.
- Wissel, H., Lehfeldt, A., Klein, P., Müller, T. & Stevens, P. A. (2001). Endocytosed SP-A and surfactant lipids are sorted to different organelles in rat type II pneumocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281, L345-360.
- Wolters, P. J., Raymond, W. W., Blount, J. L. & Caughey, G. H. (1998). Regulated expression, processing, and secretion of dog mast cell dipeptidyl peptidase I. *J Biol Chem* 273, 15514-15520.
- Worlitzsch, D., Tarran, R., Ulrich, M., Schwab, U., Cekici, A., Meyer, K. C., Birrer, P., Bellon, G., Berger, J., et coll. (2002). Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway Pseudomonas infections of cystic fibrosis patients. *J Clin Invest* 109, 317-325.
- Wright, J. R. & Youmans, D. C. (1993). Pulmonary surfactant protein A stimulates chemotaxis of alveolar macrophage. *Am J Physiol* 264, L338-344.
- Wright, J. R. (2005). Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol* 5, 58-68.
- Xia, L., Kilb, J., Wex, H., Li, Z., Lipyansky, A., Breuil, V., Stein, L., Palmer, J. T., Dempster, D. W. & Brömme, D. (1999). Localization of rat cathepsin K in osteoclasts and resorption pits: inhibition of bone resorption and cathepsin K-activity by peptidyl vinyl sulfones. *Biol Chem* 380, 679-687.
- Yamada, C., Sano, H., Shimizu, T., Mitsuzawa, H., Nishitani, C., Himi, T. & Kuroki, Y. (2006). Surfactant protein A directly interacts with TLR4 and MD-2 and regulates inflammatory cellular response. Importance of supratrimeric oligomerization. *J Biol Chem* 281, 21771-21780.
- Yanamandra, N., Gumidyala, K. V., Waldron, K. G., Gujrati, M., Olivero, W. C., Dinh, D. H., Rao, J. S. & Mohanam, S. (2004). Blockade of cathepsin B expression in human glioblastoma cells is associated with suppression of angiogenesis. *Oncogene* 23, 2224-2230.
- Yasothornsrikul, S., Greenbaum, D., Medzihradsky, K. F., Toneff, T., Bunday, R., Miller, R., Schilling, B., Petermann, I., Dehnert, J., et coll. (2003). Cathepsin L in secretory vesicles functions as a prohormone-processing enzyme for production of the enkephalin peptide neurotransmitter. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 9590-9595.
- Yasuda, Y., Li, Z., Greenbaum, D., Bogoy, M., Weber, E. & Brömme, D. (2004). Cathepsin V, a novel and potent elastolytic activity expressed in activated macrophages. *J Biol Chem* 279, 36761-36770.

Young, A., Gentzsch, M., Abban, C. Y., Jia, Y., Meneses, P. I., Bridges, R. J. & Bradbury, N. A. (2009). Dynasore inhibits removal of wild-type and DeltaF508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) from the plasma membrane. *Biochem J* 421, 377-385.

Annexes : Revues générales



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Review

Kininogens: More than cysteine protease inhibitors and kinin precursors

Gilles Lalmanach^{a,*}, Clément Naudin^a, Fabien Lecaille^a, Hans Fritz^b^aINSERM U618, Protéases et Vectorisation Pulmonaires, IFR 135 Imagerie Fonctionnelle, Université François Rabelais, Tours, France^bAbteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie, Chirurgische Klinik, Ludwig-Maximilians-Universität München, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 January 2010

Accepted 10 March 2010

Available online 24 March 2010

Keywords:

Aging

Angiogenesis

Cathepsin

Cystatin

Cysteine protease

Kininogen

ABSTRACT

Two kininogens are found in mammalian sera: HK (high molecular weight kininogen) and LK (low molecular weight kininogen) with the exception of the rat which encompasses a third kininogen, T-Kininogen (TK). Kininogens are multifunctional glycosylated molecules related to cystatins (clan IH, family I25). They harbor three cystatin domains but only two of them are tight-binding inhibitors of cysteine cathepsins. HK and LK, but not TK, are precursors of potent peptide hormones, the kinins, which are released proteolytically by tissue and plasma kallikreins. Besides these classical features novel functions of kininogens have been recently discovered; they are described in the second part of this review. HKa, which corresponds to the kinin-free two-chain HK and its isolated domain D5 (kininostatin), possesses angiostatic and pro-apoptotic properties, inhibits the proliferation of endothelial cells and participates in the regulation of angiogenesis. Moreover, some HK-derived peptides display potent and broad-spectrum microbicidal properties against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, and thus may offer a promising alternative to conventional antibiotic therapy. Of seminal interest, a kininogen-derived peptide inhibits activation of the contact phase system of coagulation and protects mice with invasive *Streptococcus pyogenes* infection from pulmonary lesions. On the other hand, TK is a biomarker of aging at the end of lifespan of elderly rats. However, although TK has been initially identified as an acute phase reactant, and earlier known as alpha-I-acute phase globulin, the increase of TK in liver and plasma is not known to relate to any inflammatory event during the senescence process.

© 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. A brief aide-memoire

1.1. Kininogens as kinin precursors

Kininogens are multifunctional and multidomain glycoproteins related to cystatins (family 1: stefins; family 2: cystatins; family 3: kininogens) [1,2]. A previously proposed evolutionary scheme assumed a near simultaneous origin and diversification of stefins, cystatins and kininogens, occurring approximately one billion years ago. However, only two ancestral lineages, stefins and cystatins,

Abbreviations: ACE, angiotensin-I-converting enzyme; ADAM, a disintegrin and metalloproteinase; ADAMT, a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs; AMP, Antimicrobial peptide; BN-Ka rat, Brown Norway-Katholiek rat; FGF, fibroblast growth factor; HK, high molecular weight kininogen; KKS, kallikrein–kinin system; LK, low molecular weight kininogen; MMP, matrix metalloproteinase; TGF- β , transforming growth factor β ; TK, T-kininogen (thiostatin); VEGF, vascular endothelial growth factor; VSMC, vascular smooth muscle cell.

* Correspondence to: Gilles Lalmanach, INSERM U618, Protéases et Vectorisation Pulmonaires, Equipe Protéases et Pathologies Pulmonaires, Université François Rabelais, Faculté de Médecine, 10 Boulevard Tonnellé, F-37032 Tours Cedex, France. Fax: +33 2 47 36 60 46.

E-mail address: gilles.lalmanach@univ-tours.fr (G. Lalmanach).

0300-9084/\$ – see front matter © 2010 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.
doi:10.1016/j.biochi.2010.03.011

are present throughout the eukaryotes, while kininogens are much younger and restricted to the vertebrates and therefore originated at most 650 million years ago [3]. In contrast to stefins and cystatins, three-dimensional structures based on X-ray crystallographic or NMR data have not been solved so far for kininogens. Following a preliminary note by Abelous & Bardier in 1909 [4], between 1926 and 1939 Werle and colleagues described in their pioneering studies the nature and functional relationships of the basic components of the kallikrein–kinin system (KKS): (tissue) kallikreins, kinins, kininogens and kininases and particularly numerous pharmacological effects of peptide hormone kinins [5]. Kininogens were primarily identified as substrates from which kinins were released by kallikrein enzymes, opening a boulevard for extensive investigations of the KKS (for a didactic and historic summary see: The E.K. Frey–E. Werle Foundation of the Henning L. Voigt Family: <http://www.frey-werle-stiftung.de/>).

The first chemically characterized kinin was the nonapeptide bradykinin (Arg¹–Pro²–Pro³–Gly⁴–Phe⁵–Ser⁶–Pro⁷–Phe⁸–Arg⁹). Both kallidin (Lys–BK) and bradykinin are potent vasodilators and smooth muscle stimulators released from blood plasma by the venom of *Bothrops jararaca* [6]. They both cause the isolated guinea pig ileum to contract slowly, compared to the rapid contraction observed in the

presence of histamine or acetylcholine. Major mammalian kinins are besides BK and Lys-BK some biologically active metabolites, including des-Arg⁹-BK (Arg–Pro–Pro–Gly–Phe–Ser–Pro–Phe) and des-Arg¹⁰-kallidin. When injected into humans or animals, BK and Lys-BK reproduce archetypal signs of inflammation: redness, local heat, swelling and pain. Although kinins are short-lived mediators, they are implicated in numerous physiological and pathophysiological processes. They activate endothelial cells, induce vasodilatation and contraction of smooth muscles, enhance microvascular permeability, stimulate the production of superoxide radicals and nitric oxide, modulate the mobilization and release of histamine, arachidonic acid, prostaglandin E₂, pro-inflammatory Interleukin-1 and TNF- α . Kinins are also involved in cardiac homeostasis, in the regulation of renal function and blood pressure, and in various immune and inflammatory disorders [2,7–9]. The kinin moiety of kininogen may be submitted to post-translational modifications, such as the hydroxylation of the third proline of BK, without impairing its biological activities [10]. Supplementary kinins were found specifically in rats: T-kinin (Ile-Ser-BK) and Met-T-kinin [11]. Kinins are rapidly hydrolyzed in sera and other biological fluids by kininases (BK half-life: 27 ± 10 s [12]) including angiotensin-I-converting enzyme, neutral endopeptidase 24.11 (neprilysin), aminopeptidase P, or carboxypeptidase N [2,13,14].

The precursors of kinins in mammals are HK (apparent molecular mass of 90–120 kDa) and LK (50–68 kDa). Mammalian kininogens are glycoproteins synthesized in liver that occur predominantly in blood plasma at respective concentrations of 170/220 μ g/ml for LK and of 70/90 μ g/ml for HK [15], but are also found in other body fluids and organs such as kidney and in cells such as neutrophils [16–18]. Early purification and partial characterization of human kininogens were initiated during the 1960s and 1970s [19–21]. Both native forms have an identical N-terminal heavy chain (domains D1, D2, and D3), a short D4 domain corresponding to the BK moiety, and because of an alternative splicing of the gene transcript, two different C-terminal light chains: LK discloses a single D5 domain (D5L), while HK shares a D5 domain (D5H) along with a D6 domain [22,23]. Indeed HK and LK are coded by a single gene (also referred as K gene) located on chromosome 3 that consists of eleven exons and ten introns. The first nine exons code for the heavy chain of both kininogens, exon 10 encodes a mutual sequence for both kininogens (bradykinin and a 12-mer peptidyl moiety downstream to BK) plus the HK light chain, whereas exon 11 codes for the LK light chain (4–5 kDa) [22]. D2 and D3 domains are cystatin-like domains that act as tight-binding inhibitors of cysteine cathepsins [24–27], while the D1 domain, which has lost its inhibitory properties, may operate as a calcium transporter [28]. These three cystatin-like domains have arisen from an ancestral gene by two successive gene duplications [1,29]. According to a recent phylogenetic study two paralogous kininogen genes were initially present in vertebrates, but during evolution one original gene was saved with frequent multiplication in amphibians, yet lost in mammals [30]. In addition to its inhibitory properties, the D3 domain binds to platelets and endothelial cells (for review: [1]). It has been shown recently that a 26-mer fragment within D3 possesses a potent antibacterial activity [31]. D5 domain of HK (also called kininostatin) has cell binding sites, anti-angiogenic properties, attachment sites for heparin binding [32,33] and may be an effector of the innate immunity due to its potency to kill bacteria [34]. Such bactericidal properties are described later in this review (see section II). HK binds to negatively charged surfaces through a cluster of His residues located in its D5 domain (D5H). The D6 domain has prekallikrein- and factor XI-binding sites [1]. In contrast to HK, LK light chain (D5L) lacks prekallikrein-binding sites and hence contact activation capability; its function remains unclear. While a reduced circulating level of both kininogens has been reported under pathological conditions

such as cirrhosis [35], surprisingly kininogen deficiency in humans is apparently asymptomatic [36].

Both rat LK and HK also arise from a single gene (K gene) by alternative splicing. However, they encompass some peculiar features, since Arg-bradykinin is found instead of Lys-bradykinin, and tissue kallikrein releases BK and not kallidin [37]. Moreover, rat plasma contains a third type of kininogen, so-called T-kininogen (TK) (for review see [38]). This additional kininogen (formerly known as α -I-acute phase globulin) is the only mammalian kininogen described to date whose concentration increases dramatically during inflammation [39]. TK was first identified as an acute phase reactant in rat serum [40] and later found to be identical to α -I-cysteine proteinase inhibitor [41]. TK, unlike HK and LK, is not subject to kallikrein hydrolysis. Trypsin, however, cleaves TK and releases T-kinin (Ile-Ser-bradykinin) [42], while cathepsin D may release Met-T-kinin-Leu, but not T-kinin, from TK [43]. In addition cathepsin D may degrade and inactivate an isolated domain (D3) of kininogen as well human stefins A and B, and cystatin C [44,45]. Therefore TK has also been called thiostatin, a name thought to better fit its presumed biological function as a cysteine protease inhibitor [46]. TK exists in two closely related forms (TK-I and TK-II). The sequences of the mRNAs coding for the two TKs and rat LK are more than 90% homologous. However, TKs are generated by two distinct TK genes (T-I and T-II genes), which appears to have been created as a sidetrack evolutionary product through duplication of the K gene after the divergence of rat and mouse [30,47]. The rat Brown Norway–Katholiek strain carries a congenital kininogen deficiency (i.e. HK- and LK-deficient rats) while the production of TK remains unaffected. A puzzling observation is that the Katholiek strain does not show any physiological difference from parental, normal kininogen-producing (Brown Norway) strain as described in human kininogen-deficient counterparts [37].

The two major pathways for kinin generation, which fulfill different functions, are the plasma kallikrein–kinin system, which initiates the activation of the intrinsic coagulation cascade, and a simpler pathway involving tissue kallikrein [2,8,48,49]. Human tissue kallikrein (hK1 or KLK1) belongs to a family of 15 kallikrein-related peptidases (for a recently updated nomenclature see: [50]). Unlike other members of this family, hK1 releases Lys-BK from LK by cleaving the Met379–Lys380 and Arg389–Ser390 bonds, also in HK. The plasma kinin-forming system (contact system) typically involves three serine protease zymogens (factor XII or Hageman factor, factor XI, and plasma prekallikrein) and HK. Plasma kallikrein is synthesized in the liver and secreted by hepatocytes as an inactive zymogen predominantly associated with HK in the bloodstream. Contact of plasma with negatively charged surfaces (e.g. in sulfated proteoglycans or endotoxins) leads to a cascade of proteolytic episodes including the auto-activation of Hageman factor. Finally prekallikrein is converted to kallikrein by factor XIIa, and the newly formed plasma kallikrein cleaves HK to release BK [51]. Binding of HK to glycosaminoglycans blocks the release of BK into the plasma and on surfaces of endothelial cells [52]. Alternatively, activation may be initiated by binding of constituents of the contact activation cascade to the surface of leukocytes, platelets, or endothelial cells. This pathway involves a multi-protein receptor which consists of at least cytokeratin-1, urokinase plasminogen activator receptor, and gC1qR [48,53]. Proteases involved in the intrinsic clotting cascade and kinin generation may also trigger the activation of the complement system. The contact activation phase is regulated in plasma by inhibitors such as antithrombin III, C1-inhibitor, α 2-macroglobulin and α 1-proteinase inhibitor. The C1-inhibitor and α 2-macroglobulin are the main plasma kallikrein inhibitors [54–56]. On the other hand hK1 may be regulated by kallistatin, a kallikrein-binding protein that is found in many tissues, cells, and fluids [57]. In research settings, both hK1 and plasma kallikrein are also inhibited by aprotinin from bovine organs [58].

Under deleterious oxidizing conditions found at inflammatory sites, the release of kinins from kininogens by plasma and tissue kallikreins is significantly decreased, although local kinin production still seems to occur. Obviously a combined action of tryptase and neutrophil elastase may lead to the release of kinins from oxidized kininogens (with a methionine sulfoxide two residues upstream of the N-terminus of BK), suggesting that alternative proteolytic pathways may produce kinins [59]. A similar kininogenase activity was previously assigned to the synergistic action of the plasma kallikrein/neutrophil elastase duo [60] and to calcium-dependent cysteine proteases, the calpains [61,62]. More recently we observed that cathepsin L liberates kinins from HK at slightly acidic pH suggesting that this could represent a surrogate pathway for kinin production under physiopathological conditions [63,64]. Conversely cathepsin B does not act as a potential kininogenase [64] but cleaves HK within its BK moiety (Naudin, Lecaille & Lalmanach, unpublished data). The finding that cathepsin L is a potential kinin-releasing protease was confirmed by a pharmacological *in vivo* study of Juliano and coworkers [65]. After intravenous injection in rats, cathepsin L induces a hypotensive effect that correlates with a concomitant kinin generation and kininogen depletion. Surprisingly, despite a very similar enzymatic specificity [66], cathepsin K has an antagonist effect since it does not release BK from its precursors but cleaves BK *in vitro* releasing two pharmacologically inactive metabolites BK(1–4) and BK(5–9) and induces a dose-dependent contraction of bronchial smooth muscles [67] (for review: [68]). Cathepsin K may also act as a potent kininase in bloodstream by attenuating kallikrein-induced decrease of rat blood pressure and reducing significantly the hypotensive effect of BK [69].

Kinins exert their biological effects by activating constitutive (B2-type) kinin receptors and inducible (B1-type) kinin receptors, which recruit similar signaling pathways but are less susceptible to desensitization [70]. These are G protein-coupled receptors (GPCRs) with seven transmembrane domains. The amino acid compositions of these two receptor subtypes are relatively dissimilar in humans, with most of the similarities being located in the transmembrane regions. Both of them stimulate the phospholipase C-mediated release of inositol phosphate, thus leading to increased intracellular calcium. BK and kallidin are the endogenous agonists of the predominant B2 receptor which is ubiquitously present in numerous cells [71]. Unexpectedly human B2 receptors may be directly activated by both plasma kallikrein and hK1 in the absence of kinins [72]. Furthermore, this activation is blocked by Icatibant (Hoe140), the archetypal B2 receptor antagonist, supporting the notion that the B2 receptors may be related to serine-protease-activated receptors. B2 receptor-knockout mice have increased blood pressure, elevated heart/body weight ratio, reduced paw edema in response to carrageenan injection, and chronic dietary salt loading. These features support the evidence that endogenous kinins have hypotensive properties and can challenge the effects of the antidiuretic vasopressin [73,74]. In contrast, des-Arg9-BK (and to a lesser extent des-Arg10-kallidin) binds with high affinity to B1 receptors, which are generally absent from normal tissues but are induced during inflammatory episodes [75]. Following the original work of Stewart dedicated to the design of BK receptor antagonists (see e.g. [76,77], it has been proposed that kinin B1 receptors represent innovative and alternative targets for the treatment of chronic pain and inflammation (e.g. severe synovitis) as well as of some infectious diseases (e.g. endotoxic shock) [78].

1.2. Kininogens as cysteine protease inhibitors

Cysteine cathepsins belong to the papain-like cysteine proteases of the family C1 (Merops: The peptidase database [79]). Members of

this family (eleven in humans) are located primarily within the endosomal/lysosomal compartments of cells [80] but are also found in active form in the pericellular environment as soluble enzymes or bound to cell surface receptors at the plasma membrane [81]. With the exception of cathepsin S, mammalian cathepsins have an acidic pH optimum. Their primary and historically reported function is the intracellular degradation and turnover of cellular or endocytosed proteins [82]. Mammalian cathepsins also fulfill more specific biological functions in MHC-II antigen presentation [83], adipogenesis and glucose tolerance [84], collagen degradation [85], extracellular matrix turnover [86] or prohormone processing [87,88], and are involved in various pathophysiological conditions (e.g. Alzheimer's disease, atherosclerosis, adiposity, angiogenesis, tumor invasion, muscular dystrophy, osteoporosis, rheumatoid arthritis, pulmonary hypertension) [89]. More recently cysteine proteases have also been proposed as reliable disease biomarkers [90–92].

Kininogens, which were initially found to be identical with alpha-cysteine proteinase inhibitors [93], are abundant natural inhibitors of cysteine cathepsins. They belong to the cystatin superfamily (family 3; MEROPS family I25 [79]) and interact via a reversible inhibitory mechanism with their target enzymes [25]. Highly conserved residues or fragments which participate in inhibition were initially identified by sequence homology analysis [94–96]. X-ray diffraction studies have shown that these regions are spatially contiguous and form a wedge-shape edge highly complementary to the active site of the protease [97]. These three conserved regions correspond to (i) a substrate-like N-terminal segment that includes a conserved glycyl residue and which possibly accommodates the S1–S2 subsites of the protease, (ii) a central pentapeptide QVVAG, which is the most frequently found variant of the QxVxG consensus sequence and which stabilizes the inhibitory complex via an area of extended contact with the protease, and (iii) a third region, near the C-terminal end, which usually contains a tryptophane residue flanked by a conserved proline [98]. However the mechanism of inhibition by cystatins, as illustrated by Machleidt and coworkers (1989) [99], is still not yet fully understood and may depend on individual members of the cystatin superfamily, since some discrepant results have been reported on the relative importance of the different cystatin segments involved in the inhibition of cysteine proteases. For example, N-terminal truncations of stefin B and phytocystatins do not modify their inhibitory potential [100,101]. Both LK and HK harbor three tandemly repeated type 2-cystatin domains in their heavy chain (domain 1: D1; domain 2: D2; domain 3: D3). However only D2 and D3, but not D1, which does not encompass the central QVVAG pentapeptide, are functionally active inhibitors of cysteine proteases [95]. HK and LK are potent inhibitors of papain, cathepsins L, S, and H (Ki in the 10^{−9} M range) but weakly inhibit cathepsin B (Ki in 10^{−6} M range) [1]. They obey a 2:1 enzyme:inhibitor stoichiometry, and each domain binds a cathepsin molecule independently with different rate constants, D3 being both the faster and tighter-binding site [26,102]. We recently reported that human kininogens have Ki values for cathepsin K comparable to those of cathepsins L and S [103]. Similarly, rat TK is a potent inhibitor of cathepsins B, H and L with tighter interactions observed with cathepsin L (Ki = 0.18 nM) [104]. LK and HK display “proteinase-sensitive regions” which are located at the junctions of the three domains constituting the heavy chain [105]. Following their release by limited proteolysis, isolated cystatin-like domains D2 and D3 remain tight-binding inhibitors of cysteine cathepsins [24,105]. Similar results were reported with their corresponding recombinant forms [106,107]. Proteolytic fragments of T-kininogen also inhibited cathepsin L and papain very strongly and even better than the uncleaved molecule for some of them, while no significant inhibition of cathepsins B and H was observed [104]. Whereas human LK and its isolated D2 domain are potent inhibitors of chicken calpain (Ki ~ 1 nM) [24], bovine calpains are not

susceptible to inhibition by native TK or its proteolytic fragments. Although the mechanism of inhibition of cysteine proteases by kininogens is closely related, subtle differences may exist. Rabbit antibodies directed against a synthetic peptide encompassing sequences thought to be crucial for the inhibitory function react specifically with human LK, HK and their tryptic fragments, but not with TK. Those antibodies also recognize kininogens from various mammalian sera (rat, swine, ox, goat, horse, guinea pig and human), but fail to react with sera from Brown Norway-Katholiek rats [108]. Finally, antibodies block the capability of HK and LK, but not of TK, its isolated D3 domain or family 2 cystatins, to inhibit papain. Taken together these data indicate that antibodies directed against a conformational epitope at or near the inhibitory site distinguish fine structural differences between TK and both LK and HK, and support the notion that the mechanism of inhibition of cysteine proteases by TK (thiostatin) and “true” kininogens may slightly differ [109]. Potentially interesting, we previously observed that TK and its domains D2 and D3 are able to enhance (approx. 10-fold increase) NO production by peritoneal interferon-gamma-activated macrophages [110]. This stimulation of NO release is triggered by tumor necrosis factor and interleukin-10 [111]. Upon complexation with saturating amounts of reduced alkylated papain, which retains the ability to bind tightly with inhibitors, TK, like stefin B and chicken cystatin, remains effective in increasing NO production, which demonstrates that this mechanism is not related to cystatin inhibitory properties [110].

2. Emerging functions of kininogens

2.1. Kininogens and angiogenesis

Angiogenesis is defined as the formation of new vessels from preexisting ones. In addition to tumor and metastatic growth that are closely controlled by neovascularization, angiogenesis plays a key role in pathologies such as (i) rheumatoid arthritis, psoriasis, or retinopathy (excessive angiogenesis), and (ii) osteoporosis, atherosclerosis, emphysema or myocardial ischemia (insufficient angiogenesis) [112]. Molecular mechanisms involved are extremely complex, since they obey a multifactorial regulation closely monitored by a balance between positive (activators) and negative regulators [113–115]. For instance, both VEGF (vascular endothelial growth factor) and FGF (Fibroblast Growth Factor) trigger angiogenesis, while thrombospondin acts as an endogenous negative regulator. The notion of balance applies also to proteolytic systems, since an excessive proteolysis may favour migration and infiltration of endothelial cells and lead to the formation of aberrant vascular structures. This is partly achieved through pericellular proteases that are involved in the regulation of the cytokines, such as activation of TGF- β (transforming growth factor β) or liberation of FGF (fibroblast growth factor) and VEGF (vascular endothelial growth factor) [116]. Proteases participate also in the release of cryptic fragments from extracellular matrix (ECM) or basement membrane (BM) components that may regulate angiogenesis positively or negatively [117,118]. For example, angiostatin and endostatin, which result from the degradation of plasminogen or collagen XVIII, display potent angiostatic activity [119]. For a long time, most studies have focused on the role of serine proteases and metallo proteinases including MMP-2, MMP-9 and MMP-12, and related enzymes (ADAM and ADAMTS) in the destruction and/or remodeling of main matrix components [120], and several proteolytic cascades have been extensively described. Besides participating in the activation of plasminogen to plasmin and in the degradation of the ECM, urokinase and its receptor uPAR are also involved in other proteolytic processes (such as conversion of pro-MMPs to MMPs by plasmin) and in signaling through integrins [121]. More recently the crucial roles and activities of cysteine cathepsins (both from malignant cells

and from stromal cells) in cancer progression and during angiogenesis have gained an increased interest (cf some comprehensive reviews [122–124]). Interestingly, in the specific context of tumor microenvironment the invasiveness of highly metastatic cancer cells may be enhanced by voltage-gated sodium channels that favour the pH-dependent activity of extracellular cysteine cathepsins [125]. In an elegant study, Hanahan and coworkers demonstrated that cathepsins B and S are essential to promote the angiogenic switch using as animal model RIP1-Tag2 mice with pancreatic cancer [126]. In addition, the deficiency of cathepsins B or S, but not cathepsin L, inhibits angiogenesis and the formation of new tumors, and E-cadherin, a cell adhesion molecule, was identified as a common target for these proteases [127]. However cathepsin L appears essential for neovascularization of endothelial cells and significantly increases their invasive potential [128]. In the RIP1-Tag2 model, the use of a broad-spectrum pharmacological inhibitor of cysteine cathepsins without apparent toxicity showed profound effects on tumor growth and invasiveness and disrupted both early and late stages of tumorigenesis, suggesting its potential benefit in cancer treatment [126]. However one should consider carefully these results until the exact roles of individual cysteine cathepsins are fully understood [129]. Indeed, other studies have shown tumor-suppressive effects of cysteine proteases [130,131].

Antagonistic to cysteine cathepsins [132], their natural inhibitors may play an important role in angiogenesis as well. Shi and colleagues have shown that the deficiency of cathepsin S decreases angiogenesis and tumor growth, whereas deletion of cystatin C leads to an opposite phenotype [133]. A growing number of recent studies illustrate that HK and kinins may participate actively in angiogenesis. Indeed, recent investigations indicate that the plasma kallikrein–kininogen–kinin system is also involved in regulation of endothelial cell proliferation, angiogenesis and apoptosis [134]. Auto-activation of Hageman factor leads finally to the release of BK and the generation of a cleaved kininogen known as HKa, corresponding at least to a two-chain kinin-free HK with a heavy chain and a light chain remaining connected by a single disulfide bond. Of major interest, the production of these two molecules underlines the opposing actions of HK and reveals a supplementary molecular stage of fine regulation of angiogenesis, since BK promotes angiogenesis while HKa exhibits highly potent angiostatic properties [32]. Interestingly, due to a spontaneous kininogen deficiency resulting from a single mutation (H163D) Brown Norway-Katholiek (BN-Ka) rats cannot generate BK and display decreased angiogenesis [135] confirming pro-angiogenic properties of BK. Conversely, the administration of a BK analog markedly promotes angiogenesis, associated with an upregulation of VEGF [135,136]. Daily injections of kininogen to BN-Ka rats enhance angiogenesis, while inoculation of carcinoma cells into BN rats results in rapid development of solid tumors associated with marked angiogenesis. By contrast, tumor weights as well as angiogenesis are significantly reduced in BN-Ka rats [137]. BK, via binding to its B1 receptor, promotes angiogenesis in rabbit cornea by regulating expression of endogenous FGF-2 [138]. Likewise, the pro-angiogenic effect of BK is mediated by stimulation of stromal B2 receptor signaling via up-regulation of bFGF and VEGF [139] and is abolished by a B2 receptor antagonist (i.e. Hoe140) [140]. Moreover, it was demonstrated that the pro-angiogenic effect induced by inhibition of ACE is regulated by BK through the B2 receptor [141].

A decade ago, Colman and coworkers published a study demonstrating unambiguously that two-chain high molecular weight kininogen (HKa) is an angiogenesis inhibitor [142]. Nearly simultaneously, McCrae's group showed that HKa inhibits neovascularization of subcutaneously implanted Matrigel plugs and rat corneal angiogenesis [143]. Similar effects were found using an *in vivo* model of chicken chorioallantoic membrane [144]. This potent

anti-angiogenic activity is mediated through tight-binding to cell surface tropomyosin and is associated with inhibition of proliferation and induction of endothelial cell apoptosis [145] (Fig. 1). Following BK release, HKa may form a complex with vitronectin via its RGD motif and thus prevent its complexation with $\alpha(v)\beta3$ integrin. HKa shows anti-adhesive properties in vitronectin-dependent cell adhesion and induces an increase in apoptosis of human umbilical vein endothelial cells and vascular smooth muscle cells (VSMCs) through the caspase 3 pathway [146]. Molecular mechanisms involved in this process are cell-specific, since HKa selectively inhibits the proliferation of human umbilical vein and dermal microvascular endothelial cells, but does not affect that of aortic smooth muscle cells, trophoblasts and fibroblasts [143]. Moreover, oxidative stress is crucial in mediating the activity of HKa. Indeed the ability of HKa to induce endothelial cell apoptosis is dependent on the generation of intracellular reactive oxygen species in association with lipid peroxidation [147]. This pro-apoptotic activity is regulated by different ECM proteins. HKa inhibits cell adhesion to vitronectin and gelatin and induces apoptosis of endothelial cells grown on vitronectin and gelatin but not of cells grown on fibronectin. Among potential HKa-driven signal transduction pathways, HKa induces a significant up-regulation of Cdc2 kinase, a member of the cyclin-dependent protein kinase (Cdk) family, and of cyclin A that closely correlates with a marked increase of apoptosis [148]. Both anti-adhesive and apoptotic effects of HKa are associated with its ability to inhibit phosphorylation of two signaling molecules, focal adhesion kinase and paxillin [149]. Src family kinases (SFKs) have been shown to promote the formation of tubes, a process that is closely related to *in vivo* angiogenesis, and to prevent their regression during capillary morphogenesis. A recent study has shown that HKa inhibits Src family kinase activity by disrupting the complex between uPAR, $\alpha(v)\beta3$ integrin and Src [150]. Furthermore, HKa contributes to the inhibition of tube formation by blocking uPAR internalization and uPA-induced ERK phosphorylation [151]. HKa and its isolated D5 domain also alter PI3-kinase-Akt signaling by inhibiting phosphorylation of Akt and its downstream effector GSK-3 following stimulation with VEGF and sphingosine 1-phosphate [152].

Ferritin, a protein playing an essential role in iron storage, binds to native kininogen and inhibits the release of BK by kallikrein [153] as well as by the synergistic action of elastase and tryptase [154]. Ferritin also binds to HKa with high affinity via a 22-mer subdomain, antagonizes the anti-angiogenic effects of HKa by enhancing the migration, assembly and survival of HKa-treated endothelial cells independently of their iron status. In addition, ferritin opposes the anti-angiogenic effects of HKa in a human prostate cancer xenograft by restoring tumor-dependent vessel growth [155]. HKa also affects the regulation of matrix metallo proteinases and their tissue inhibitors (TIMPs) in VSMCs by decreasing IL-1 α -induced release of MMP-9 and MMP-2 [156]. Conversely, elevated basal mRNA expression levels of MMP-2 and TIMP-2 were found in VSMCs derived from kininogen-deficient rats [156]. Moreover HKa inhibits the tube forming capacity of endothelial progenitor cells by suppression of MMP-2 activation, and blocks both the conversion of pro-MMP-2 to MMP-2 and the association between pro-MMP-2 and $\alpha v \beta 3$ integrin [157].

Anti-angiogenic properties of HKa relate most probably to structural changes following HK cleavage and loss of its bradykinin moiety because the native kininogen is devoid of such properties [32]. By analogy with other angiostatic factors, the D5 domain (D5H) that contributes predominantly to HKa properties has been also called kininostatin [158]. Conversely, cleaved LK, as well as its isolated D5L whose sequence differs significantly from kininostatin, is devoid of any anti-angiogenic activities. The D3 and D5 domains from HK share structural motifs responsible for their high affinity binding to neutrophils, monocytes, platelets and endothelial cells, but with different membrane receptors or at different sites within the same receptor. The transition from uncleaved kininogen to two-chain HKa involves major conformational changes leading to a greater exposure of the D5 region, and such domain rearrangements favour improved anti-adhesive properties [158]. Interestingly, D5H contains a His-rich Zn^{2+} -binding motif that modulates its proper folding [159,37,160]. Mapping studies indicated that a peptide at the C-terminus of kininostatin (G486-K502) inhibits cell migration, while the N-terminal peptide G440-H455 is responsible for the inhibition of cell proliferation. Furthermore, like HKa and

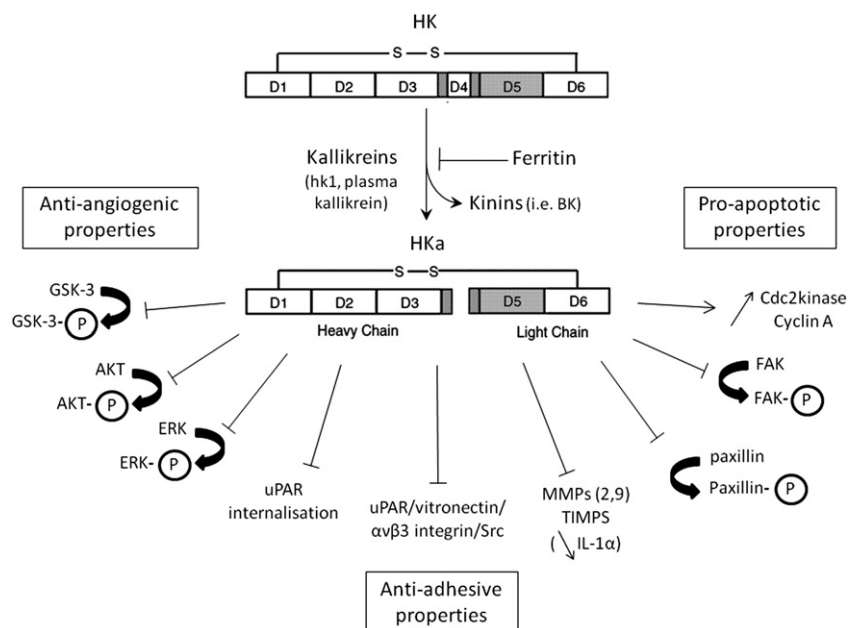


Fig. 1. Schematic outline of anti-angiogenic, pro-apoptotic and anti-adhesive properties of HKa. HK consists of a single chain of six domains, which is divided into a heavy chain (D1, D2, and D3), a kinin moiety (D4), and a light chain (D5, and D6). A disulfide bond joins the heavy chain and the light chain. HKa corresponds to the two-chain kinin-free HK following kinin release by kininogenases. Isolated domain D5 is also called kininostatin.

kininostatin, short peptides derived from endothelial cell binding regions in HKa D5 impair proliferation and induce cell apoptosis in a Zn^{2+} -dependent manner [144]. On platelets two receptors have been identified. Kininogen binding to the GPIb/IX/V complex is primarily due to the D3 domain and prevents high affinity thrombin binding [161]. The other receptor is for the globular heads of complement component C1q (gC1qR) and also expressed on endothelial cells [33]. Additional binding sites at cell surfaces have been described including cytokeratin-1 (CK-1), thrombospondin, glycoprotein 1B, and uPAR [162]. However under physiological conditions uncleaved kininogen is present in high molar excess over HKa and interferes with HKa binding to uPAR [163]. Interestingly, the uPAR-gC1qR complex may gather HK at the cell surface [32]. Following stimulation with VEGF, kininostatin co-localizes on endothelial cells in caveolae, which are specialized components of membrane lipid rafts, with both uPAR and caveolin-1, but not with cytokeratin-1 and gC1qR. Furthermore, kininostatin inhibits the formation of the complex between $\alpha(v)\beta3$ integrin, uPAR and caveolin-1, and suppresses integrin-mediated adhesion, which leads to a critical down-regulation of $\alpha(v)\beta3$ integrin signaling [164]. Likewise HKa and D5, by preventing the co-localization of uPAR and epidermal growth factor receptor (EGFR), block migration and invasive ability of human prostate cancer cells, thus emphasizing the therapeutic potential of HK to decrease metastasis in prostate cancer [165]. Furthermore HK, via its D3 and D5 domains, is able to bind to neutrophils and monocytes by interacting with the adhesion protein Mac-1 [166]. This binding may be impaired by antibodies directed against Mac-1, gC1qR and uPAR proteins [167]. Both HK and HKa strongly inhibit fibrinogen binding to Mac-1 and ICAM-1 as well, resulting in the inhibition of leukocyte adhesion to fibrinogen and to endothelial cells [168]. Both heparan sulfate and chondroitin sulfate glycosaminoglycans have also been proposed to be additional targets at cell membranes with kininogen binding properties [169–171].

Puzzling points remain unresolved. It has been established that, after HK cleavage, HKa persists in the circulation for a longer time (half-life ~ 9 h [53]). But whether HKa or HK may be further proteolyzed *in vivo* to release D5 has not been demonstrated despite evidences which support this possibility [33]. HK is also subject to proteolysis, not only by plasma and tissue kallikreins, by also by factor XIa with the cleavage sites R409–R410, K502–T503 and K325–K326 [172]. Among the generated peptides one contains the amino acid sequence between Arg410 and Thr503 which is similar to kininostatin [172], suggesting that D5, in addition to HKa, might circulate in plasma under pathophysiological conditions, and thus may participate in angiogenesis regulation.

In summary, the involvement of cysteine cathepsins in the positive regulation of angiogenesis, especially by promoting the angiogenic switch, is well established [173], and conversely, some protease inhibitors related to the cystatin family 2 may delay or limit angiogenesis by regulating proteolytic activities of their target enzymes. Likewise kininostatin, which has no inhibitory activity against cysteine proteases, is also a potent anti-angiogenic protein. In addition to domain D5 (kininostatin), HKa retains tight-binding inhibitory potency towards cathepsins through its intact heavy chain, but it remains unknown whether cystatin-like domains D2 and D3 may play, independently of cell adhesion properties and dysregulation of signaling pathways, a complementary role in angiogenesis through a partial control of the cathepsin-dependent proteolysis.

2.2. T-kininogen as a reliable biomarker of aging

Aging is characterized by a loss in responsiveness to external stimuli and by a decline in physiological functions. Molecular

mechanisms leading to and responsible for the maintenance of the senescent phenotype *in vivo* comprise both systemic and cellular components [174]. Many features characterize senescence at the cellular level. Those include the decrease in stress resistance and repair mechanisms as well as the accumulation of modified and/or damaged proteins, corresponding to a reduced cellular protein catabolism (for review see [175]).

As a consequence of a differential screening of a cDNA library constructed from old Sprague–Dawley rat liver mRNA and conducted initially with the purpose of defining a biomarker of senescence, Sierra and colleagues published the first evidence of a strong correlation between TK gene expression and aging (1989). Authors observed that, while TK (an acute phase reactant) is the only mammalian kininogen described to date whose concentration enhances significantly during inflammation, the increase of TK mRNA in aged animals does not relate to any acute inflammatory processes, and operates apparently at the gene transcription level [176]. Following this initial report aimed to identify new biological markers involved in the senescence process and to delineate biological changes such as disruption of the intracellular protein degradation machinery accompanying aging, other studies were pursued. A similar 9–10-fold increase of TK specific mRNA at the end of lifespan in several other rat strains has been reported [177]. The serum protein level of thioistatin in senescent Sprague–Dawley rats is also augmented, although less dramatically compared to its mRNA expression. Despite TK being primarily a circulating plasma protein, it also accumulates intracellularly in the liver (hepatocytes and Kupffer cells) of aged rats. This cumulative effect tightly correlates with the lifetime of the animal, the over-expression of TK occurring between 2.5 and 4 months before death [178]. A dietary restriction, corresponding to an age-prolonging treatment, effectively diminishes the over-expression of TK in 24-month-old rats. However, this is a transient phenomenon in these food-restricted animals, since the over-expression of TK is only delayed and occurs several months before death as similarly observed in control animals. The increase in TK gene expression does not correlate with inflammatory processes, as the TK serum level follows a negative parallel behaviour with the ability of splenocytes to proliferate in response to lipopolysaccharides [179]. A similar link is not observed with other inflammation markers, including α -1-acid glycoprotein, haptoglobin, and interleukin-10. Since different strains of animals succumb to various pathologies, results further suggest that the rise of TK expression may relate to the process of aging *per se* rather than to any given age-related pathology [180], strongly supporting the idea that TK may be an appropriate biomarker of aging in the rat. However this up-regulation is most probably sex-dependent. Indeed in males (Fisher 344 strain) the increase in serum levels of TK follows an exponential curve whereas in females the increase is best fitted by a linear curve [179].

Titration of liver extracts indicates that elderly rats contain a 4-fold higher level of cysteine protease inhibitory activity than younger counterparts. This difference is mainly due to a decrease in free, biologically active TK, most of the intra-hepatic TK being found as enzyme–inhibitor complexes [181]. In parallel, cathepsin B activity is increased ~ 4 -times in liver homogenates of aged rats compared to younger counterparts, while steady-state levels of liver cathepsin B mRNAs remain unchanged [182]. That may correspond to an overall decreased rate in intracellular protease turnover in senescent hepatocytes, in agreement with the well-documented fact that rates of intracellular protein degradation decline with age [183].

It has been proposed that the age-dependent elevation of TK in serum could play a role in increased endothelial cell proliferation observed in aged animals. Indeed TK may induce a spreading that requires at least a complex activation of several signal transduction pathways (ERK, PI3K, AKT, PKC and PKA) [184] unlike to filarial

cystatins [185,186], suggesting that TK may be involved in the dysregulation of vascular system physiology and function occurring during aging [184]. In contrast, TK modulates the kinin-dependent cellular responsiveness [187]. Nevertheless the exact role of TK in cell proliferation is still perplexing and apparently discrepant results were reported [179,188–190], depending on how TK is administered to the cells. In addition to proteasome, cysteine proteases are involved in the control of cell proliferation although their role remains poorly understood. The presence of a synthetic inhibitor (E-64-d) of cysteine proteases, but not of serine proteases or of proteasome inhibitors, significantly down-regulates the ERK signal transduction pathway. The same results are observed with transfected mouse fibroblasts (mouse Balb/c 3T3 cells) over-expressing rat TK [190]. The inhibition of the fibroblast proliferation occurs at the G1 phase of the cell cycle [191], and most probably results from an improved stabilization of the ERK phosphatase MKP-1, which leads to an enhanced dephosphorylation and the subsequent dysregulation of the ERK pathway. Nevertheless TK-expressing mouse cell fibroblasts (under the control of a mouse metallothionein promoter) are still capable to respond to growth factors, in part via the ERK pathway and also by expressing c-Fos and c-Jun [191]. Furthermore, exposure of rat splenocytes or Jurkat cells to exogenous TK decreases both ERK activation and [³H]-thymidine incorporation. Alternatively TK does not impair [³H]-thymidine incorporation in response to IL-2 and no longer inhibits ERK activation in the presence of a calcium ionophore. Observed effects do not depend on either increased cell death or activation of kinin receptors. It has been proposed that TK like nematode cystatins may down-regulate ERK-dependent T cell proliferation, suggesting a possible role of TK in immunosenescence [188].

The proteome of elderly rat prostates (16-month-old animals) was recently investigated using an ICAT (isotope-coded affinity tag) approach [192]. Although key mechanisms underlying prostate aging remain to be identified, 34 differentially expressed proteins mostly involved in oxidative stress/detoxification, protein biosynthesis, transport, or trafficking were identified by comparison with young animals. A unique protease inhibitor is over-expressed in prostate during senescence and corresponds to both T-I and T-II forms of TK [192]. No variation of HK expression was detected in prostates of senescent rats, while a greater HK level was reported in sera of aged rats [177]. While there is one report that HK rises linearly with age in humans [193], a possible age-related increase in the expression and function of human kininogens remains an intriguing question.

2.3. HK-derived peptides as antimicrobial peptides: an alternative to antibiotic therapy?

Host invasion by pathogenic microorganisms is often associated with activation of the kinin cascade which may significantly contribute to virulence mechanisms [194]. Bacterial proteases may either release kinins directly from kininogens or activate upstream proenzymes of the kinin generation cascade [195]. A more sophisticated mechanism involving the adsorption of HK and the other components of the contact phase system on the surface of bacterial cells has also been described [196,197]. Following an early study showing that *Streptococcus pyogenes* binds kininogens through M protein, a fibrous surface protein and virulence determinant [198], it is now established that various pathogenic microorganisms (both Gram-positive and Gram-negative bacteria or *Candida* fungi) also bind kininogens, and especially HK [199]. Furthermore surface-bound kininogens could regulate cysteine proteinases released at the site of infection, such as intracellular cathepsins leaking from dead or damaged host cells, and thus protect bacteria from proteolysis [200].

Recently an essential role for the contact phase system (also known as the intrinsic pathway of coagulation) in the defence

against invasive bacterial infection by connecting it to innate immunity has emerged. Indeed, activation of the contact phase system results in the proteolytic cleavage of HK and the release of BK, which possesses *in vitro* antimicrobial properties similar to neuropeptides such as substance P and neurotensin (for review see: [201]). However, taken together its short half-life and its weak bactericidal potency, it is highly unlikely that BK exerts such an effect *in vivo*. On the other hand, D5 domain of HK has attachment sites for heparin binding via its histidine- and lysine-rich part. Such structural motifs associated with heparin affinity (cationicity, amphipaticity, and consensus regions) confer antimicrobial properties to peptides derived from laminin, von Willebrand factor, vitronectin, protein C inhibitor, and fibronectin [202]. That has raised the question whether HK or HK-derived fragments generated at bacterial surfaces could have antimicrobial activity. Intact HK has no bactericidal activity against *S. pyogenes*. Conversely, cleaved HK as a result of incubation with activated neutrophils or with elastase kills *S. pyogenes* [31]. The antimicrobial activity depends on D3-derived peptides, including a 15-kDa fragment that has been identified *in vivo*. The isolated D5 heparin-binding domain of HK also exhibits a potent antibacterial effect [34]. In contrast to D3-derived peptides acting as AMPs, and despite neutrophil proteases might release kininostatin-derived peptides, no generation of D5-derived peptidyl fragments with microbicidal potency was observed following contact phase activation at bacterial surfaces [203]. Hence it has been proposed that D3-related peptides are solely responsible for the antibacterial effect of contact activation [31]. A peptide motif responsible for the antibacterial properties of the D3 domain was identified. This 26-mer peptide (designated NAT26: NATFYFKIDNVKKARVQVAGKKYFI; residues 294–319 according to HK numbering), which displays basic physico-chemical properties (small size, high predicted helical content, positively charged, highly cationic pI) of numerous AMPs, kills *S. pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* in micromolar concentrations. Furthermore, its effectiveness against *S. pyogenes* is comparable to that of the well defined cathelicidin LL-37 [204]. The relevance of contact phase activation in bacterial elimination was demonstrated in a mouse model of infection in which the blockade of contact phase activation leads to enhanced dissemination of bacteria to the spleens of infected animals [31].

A 20-mer peptide, designated HKH20 and corresponding to residues His479–His498 (HKHGHGHGKHKNKGKNGKH) of the D5 domain of HK, binds to endothelial cells, inhibits the procoagulant activity of plasma HK, critically interferes with the assembly and activation of contact phase system enzymes by displacing HK from its binding to negatively charged surfaces without modification of proteolytic activities, and impairs the recruitment of polymorphonuclear leukocytes [205–207]. Furthermore, HKH20 binds to bacterial cell surfaces [198] and efficiently kills the Gram-negative bacteria *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa* and the Gram-positive *E. faecalis* [34]. In an earlier report, Persson et al. [208] demonstrated that pulmonary lesions induced by *Salmonella* were prevented when the infected animals were treated with a synthetic chloromethylketone inhibitor. They suggested that inhibition of contact phase system activation might be used therapeutically in lethal infectious diseases. HKH20 treatment protects mice with invasive aerobic Gram-positive *S. pyogenes* infection from massive pulmonary lesions [207]. Furthermore, it inhibits activation of the contact phase system and prevents lung bleedings. In this model of a severe infectious disease, HKH20 in combination with an antibiotic (clindamycin) also prolongates mice survival time.

Recently studies have focused on improvement of microbicidal potency of HK-derived AMPs. Kininostatin-derived peptides (GKH17: GKHKNGKKNKGKNGWK; HKH17: HKHGHGHGKHKNKGKKN) that are tagged by hydrophobic stretches display higher resistance to

proteolysis by pathogenic enzymes (human leukocyte elastase, staphylococcal aureolysin and V8 proteinase). Furthermore, addition of hydrophobic stretches results in enhanced killing of both Gram-positive and Gram-negative strains and fungal *Candida albicans*, which is correlated to a higher propensity for disrupt bacterial walls. The apparent low toxicity and amplified antimicrobial potency of tagged HK-derived peptides was demonstrated in porcine *S. aureus* skin infection models [209,210]. Similar results are reported for a shorter D5-derived hydrophilic template (KNK10: KNKGKKNKGKH) via Trp/Phe end-tagging [211]. Taken as a whole, kininogen-derived peptides act as potent and broad-spectrum bactericidal AMPs. They appear to be promising candidates for development as novel therapeutic agents complementing conventional antibiotic therapy, and thus open the way to efficient and innovative treatment of various infectious diseases.

3. Concluding remarks

For decades the kininogens have been mostly studied for their properties as precursors of vasoactive hormones, the kinins, and then their ability to regulate proteolytic activity of cysteine proteases. Alongside these traditional core capabilities, emphasis has recently been put on new potential functions. Clearly, some degradation products of HK, derived from specific proteolysis by host kallikreins up to more extensive cleavage by pathogenic proteases, participate in or interfere with various biological systems or processes as diverse as angiogenesis or the intrinsic pathway of coagulation. On the other hand, the striking properties of antimicrobial peptides derived from domains D3 and D5 of HK suggest that these AMP-type molecules could be the basis for the development of therapeutically valuable compounds following the example of Pexiganan, a 22-mer analog of Magainin from the skin of the African clawed frog (*Xenopus laevis*). Thus they may provide an alternative to traditional antibiotics and thereby increase the curative arsenal of antibacterial drugs. At a more fundamental level, we may regret the absence of three-dimensional structures of kininogens (native and kinin-free two-chain forms) contrary to cystatins and stefins. Indeed it seems obvious that the amazing differences in biological activity observed between HK and HKa (or its isolated D5 domain, i.e. kininostatin) could be better understood and finely analyzed at the molecular level.

Acknowledgments

GL is grateful to Dr Jocelyn Spragg (Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA), both a former KKS researcher and a precious friend, for critically reading the manuscript. We acknowledge for their financial support VLM (Vaincre la Mucoviscidose, France). CN holds a PhD grant from VLM. We apologize for any references omitted due to space limitations.

References

- [1] W. Muller-Esterl, Novel functions of the kininogens. *Semin. Thromb. Hemost.* 13 (1987) 115–126.
- [2] K.D. Bhoola, C.D. Figueroa, K. Worthy, Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.* 44 (1992) 1–80.
- [3] D. Kordis, V. Turk, Phylogenomic analysis of the cystatin superfamily in eukaryotes and prokaryotes. *BMC Evol. Biol.* 9 (2009) 266.
- [4] J.E. Abelous, E. Bardier, Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. *C.R. Soc. Biol.* 66 (1909) 511–512.
- [5] H. Kraut, E.K. Frey, E. Werle, Über die Inaktivierung des Kallikreins. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 192 (1930) 1–21.
- [6] E.S.M. Rocha, W.T. Beraldo, G. Rosenfeld, Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol.* 156 (1949) 261–273.
- [7] A.M. Duncan, A. Kladis, G.L. Jennings, A.M. Dart, M. Esler, D.J. Campbell, Kinins in humans. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 278 (2000) R897–R904.
- [8] M.E. Moreau, N. Garbacki, G. Molinaro, N.J. Brown, F. Marceau, A. Adam, The kallikrein–kinin system: current and future pharmacological targets. *J. Pharmacol. Sci.* 99 (2005) 6–38.
- [9] D. Proud, A.P. Kaplan, Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. *Annu. Rev. Immunol.* 6 (1988) 49–83.
- [10] D.J. Campbell, The kallikrein–kinin system in humans. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28 (2001) 1060–1065.
- [11] J. Damas, The novel rat kininogen, T-kininogen, a pro-inflammatory factor or a thioester? *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 95 (1987) 67–73.
- [12] M. Cyr, Y. Lepage, C. Blais Jr., N. Gervais, M. Cugno, J.L. Rouleau, A. Adam, Bradykinin and des-Arg(9)-bradykinin metabolic pathways and kinetics of activation of human plasma. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.* 281 (2001) H275–H283.
- [13] C. Blais Jr., F. Marceau, J.L. Rouleau, A. Adam, The kallikrein–kininogen–kinin system: lessons from the quantification of endogenous kinins. *Peptides* 21 (2000) 1903–1940.
- [14] D.J. Campbell, The renin–angiotensin and the kallikrein–kinin systems. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35 (2003) 784–791.
- [15] I.M. Sainz, R.A. Pixley, R.W. Colman, Fifty years of research on the plasma kallikrein–kinin system: from protein structure and function to cell biology and in-vivo pathophysiology. *Thromb. Haemost.* 98 (2007) 77–83.
- [16] C.D. Figueroa, C.B. Gonzalez, W. Muller-Esterl, K.D. Bhoola, Cellular localization of human kininogens. *Agents Actions Suppl.* 38 (Pt 1) (1992) 617–626.
- [17] A. Hermann, P. Buchinger, B. Somlev, J. Rehbock, High and low molecular weight kininogen and plasma prekallikrein/plasma kallikrein in villous capillaries of human term placenta. *Placenta* 17 (1996) 223–230.
- [18] M. Stuardo, C.B. Gonzalez, F. Nualart, M. Boric, J. Corthorn, K.D. Bhoola, C.D. Figueroa, Stimulated human neutrophils form biologically active kinin peptides from high and low molecular weight kininogens. *J. Leukoc. Biol.* 75 (2004) 631–640.
- [19] J. Spragg, K.F. Austen, The preparation of human kininogen. II. Further characterization of purified human kininogen. *J. Immunol.* 107 (1971) 1512–1519.
- [20] J. Spragg, E. Haber, K.F. Austen, The preparation of human kininogen and the elicitation of antibody for use in a radial immuno-diffusion assay. *J. Immunol.* 104 (1970) 1348–1354.
- [21] M.E. Webster, J.V. Pierce, The nature of the kallidins released from human plasma by kallikreins and other enzymes. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 104 (1963) 91–107.
- [22] N. Kitamura, H. Kitagawa, D. Fukushima, Y. Takagaki, T. Miyata, S. Nakanishi, Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution. *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 8610–8617.
- [23] N. Kitamura, Y. Takagaki, S. Furuto, T. Tanaka, H. Nawa, S. Nakanishi, A single gene for bovine high molecular weight and low molecular weight kininogens. *Nature* 305 (1983) 545–549.
- [24] G. Salvendy, C. Parkes, M. Abrahamson, A. Grubb, A.J. Barrett, Human low-Mr kininogen contains three copies of a cystatin sequence that are divergent in structure and in inhibitory activity for cysteine proteinases. *Biochem. J.* 234 (1986) 429–434.
- [25] V. Turk, W. Bode, The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett.* 285 (1991) 213–219.
- [26] B. Turk, V. Stoka, I. Björk, C. Boudier, G. Johansson, I. Dolenc, A. Colic, J.G. Bieth, V. Turk, High-affinity binding of two molecules of cysteine proteinases to low-molecular-weight kininogen. *Protein Sci.* 4 (1995) 1874–1880.
- [27] V. Turk, V. Stoka, D. Turk, Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance. *Front Biosci.* 13 (2008) 5406–5420.
- [28] S. Higashiyama, I. Ohkubo, H. Ishiguro, M. Sasaki, T. Matsuda, R. Nakamura, Heavy chain of human high molecular weight and low molecular weight kininogens binds calcium ion. *Biochemistry* 26 (1987) 7450–7458.
- [29] N.D. Rawlings, A.J. Barrett, Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *J. Mol. Evol.* 30 (1990) 60–71.
- [30] J. Zhou, A.J. Björnsen, D.J. Coulter, T. Chen, C. Shaw, M. O'Rourke, D.G. Hirst, Y. Zhang, P. Rao, S. McClean, Bradykinin-related peptides, including a novel structural variant, (Val1)-bradykinin, from the skin secretion of Guenther's frog, *Hylarana guentheri* and their molecular precursors. *Peptides* 28 (2007) 781–789.
- [31] I.M. Frick, P. Akesson, H. Herwald, M. Morgelin, M. Malmsten, D.K. Nagler, L. Björck, The contact system – a novel branch of innate immunity generating antibacterial peptides. *EMBO J.* 25 (2006) 5569–5578.
- [32] Y.L. Guo, R.W. Colman, Two faces of high-molecular-weight kininogen (HK) in angiogenesis: bradykinin turns it on and cleaved HK (HKa) turns it off. *J. Thromb. Haemost.* 3 (2005) 670–676.
- [33] R.W. Colman, Regulation of angiogenesis by the kallikrein–kinin system. *Curr. Pharm. Des.* 12 (2006) 2599–2607.
- [34] E.A. Nordahl, V. Rydengard, M. Morgelin, A. Schmidtchen, Domain 5 of high molecular weight kininogen is antibacterial. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 34832–34839.
- [35] M. Cugno, C.F. Scott, F. Salerno, E. Lorenzano, W. Muller-Esterl, A. Agostoni, R.W. Colman, Parallel reduction of plasma levels of high and low molecular weight kininogen in patients with cirrhosis. *Thromb. Haemost.* 82 (1999) 1428–1432.
- [36] R.W. Colman, A. Bagdasarian, R.C. Talamo, C.F. Scott, M. Seavey, J.A. Guimaraes, J.V. Pierce, A.P. Kaplan, Williams trait. Human kininogen deficiency with

- diminished levels of plasminogen proactivator and prekallikrein associated with abnormalities of the Hageman factor-dependent pathways. *J. Clin. Invest.* 56 (1975) 1650–1662.
- [37] J. Damas, The brown Norway rats and the kinin system. *Peptides* 17 (1996) 859–872.
- [38] L.M. Greenbaum, H. Okamoto, T-kinin and T-kininogen. *Methods Enzymol.* 163 (1988) 272–282.
- [39] J. Urban, D. Chan, G. Schreiber, A rat serum glycoprotein whose synthesis rate increases greatly during inflammation. *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 10565–10568.
- [40] D.A. Darcy, Response of a serum glycoprotein to tissue injury and necrosis. I. The response to necrosis, hyperplasia and tumour growth. *Br. J. Exp. Pathol.* 45 (1964) 281–293.
- [41] F. Esnard, F. Gauthier, Rat alpha 1-cysteine proteinase inhibitor. An acute phase reactant identical with alpha 1 acute phase globulin. *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 12443–12447.
- [42] T. Moreau, N. Gutman, A. el Moujahed, F. Esnard, F. Gauthier, Relationship between the cysteine-proteinase-inhibitory function of rat T kininogen and the release of immunoreactive kinin upon trypsin treatment. *Eur. J. Biochem.* 159 (1986) 341–346.
- [43] W. Sakamoto, K. Fujie, M. Kaga, H. Handa, K. Gotoh, J. Nishihira, J. Kishi, T. Hayakawa, Y. Okada, Degradation of T-kininogen by cathepsin D and matrix metalloproteinases. *Immunopharmacology* 32 (1996) 73–75.
- [44] B. Lenarcic, J. Kos, I. Dolenc, P. Lucovnik, I. Krizaj, V. Turk, Cathepsin D inactivates cysteine proteinase inhibitors, cystatins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154 (1988) 765–772.
- [45] B. Lenarcic, M. Krasovec, A. Ritonja, I. Olafsson, V. Turk, Inactivation of human cystatin C and kininogen by human cathepsin D. *FEBS Lett.* 280 (1991) 211–215.
- [46] F. Gauthier, N. Gutman, T. Moreau, A. el Moujahed, Possible relationship between the restricted biological function of rat T kininogen (thiostatin) and its behaviour as an acute phase reactant. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 369 (Suppl.) (1988) 251–255.
- [47] A. Kakizuka, N. Kitamura, S. Nakanishi, Localization of DNA sequences governing alternative mRNA production of rat kininogen genes. *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 3884–3892.
- [48] A.P. Kaplan, K. Joseph, M. Silverberg, Pathways for bradykinin formation and inflammatory disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 109 (2002) 195–209.
- [49] W. Muller-Esterl, H. Fritz, Human kininogens and their function in the kallikrein–kinin systems. *Adv. Exp. Med. Biol.* 167 (1984) 41–62.
- [50] A. Lundwall, V. Band, M. Blaber, J.A. Clements, Y. Courty, E.P. Diamandis, H. Fritz, H. Lilja, J. Malm, L.J. Maltais, A.Y. Olsson, C. Petraki, A. Scorilas, G. Sotiropoulou, U.H. Stenman, C. Stephan, M. Talieri, G.M. Yousef, A comprehensive nomenclature for serine proteases with homology to tissue kallikreins. *Biol. Chem.* 387 (2006) 637–641.
- [51] R.W. Colman, R.B. Sartor, A.A. Adam, R.A. DeLa Cadena, A. Stadnicki, The plasma kallikrein–kinin system in sepsis, inflammatory arthritis, and enterocolitis. *Clin. Rev. Allergy. Immunol.* 16 (1998) 365–384.
- [52] T. Renne, K. Schuh, W. Muller-Esterl, Local bradykinin formation is controlled by glycosaminoglycans. *J. Immunol.* 175 (2005) 3377–3385.
- [53] A.H. Schmaier, R. Wahl, S.J. Fisher, D. Brenner, The pharmacokinetics of the kininogens. *Thromb. Res.* 92 (1998) 293–297.
- [54] R.A. Pixley, M. Schapira, R.W. Colman, Effect of heparin on the inactivation rate of human activated factor XII by antithrombin III. *Blood* 66 (1985) 198–203.
- [55] P.G. Gettins, Serpin structure, mechanism, and function. *Chem. Rev.* 102 (2002) 4751–4804.
- [56] J.C. Rau, L.M. Beaulieu, J.A. Huntington, F.C. Church, Serpins in thrombosis, hemostasis and fibrinolysis. *J. Thromb. Haemost.* 5 (Suppl. 1) (2007) 102–115.
- [57] J. Chao, R.Q. Miao, V. Chen, L.M. Chen, L. Chao, Novel roles of kallistatin, a specific tissue kallikrein inhibitor, in vascular remodeling. *Biol. Chem.* 382 (2001) 15–21.
- [58] H. Hoffmann, M. Siebeck, O. Thetter, M. Jochum, H. Fritz, Aprotinin concentrations effective for the inhibition of tissue kallikrein and plasma kallikrein in vitro and in vivo. *Adv. Exp. Med. Biol.* 247B (1989) 35–42.
- [59] A. Kozik, R.B. Moore, J. Potempa, T. Imamura, M. Rapala-Kozik, J. Travis, A novel mechanism for bradykinin production at inflammatory sites. Diverse effects of a mixture of neutrophil elastase and mast cell tryptase versus tissue and plasma kallikreins on native and oxidized kininogens. *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 33224–33229.
- [60] F. Sato, S. Nagasawa, Kinin release from human LMW-kininogen by the cooperative action of human plasma kallikrein and leukocyte elastase. *Adv. Exp. Med. Biol.* 247A (1989) 493–498.
- [61] S. Higashiyama, H. Ishiguro, I. Ohkubo, S. Fujimoto, T. Matsuda, M. Sasaki, Kinin release from kininogens by calpains. *Life Sci.* 39 (1986) 1639–1644.
- [62] M. Sasaki, M. Kunitatsu, I. Ohkubo, Role of calpains and kininogens in inflammation. *Acta Biol. Hung.* 42 (1991) 231–242.
- [63] C. Desmazes, L. Galineau, F. Gauthier, D. Bromme, G. Lalmanach, Kininogen-derived peptides for investigating the putative vasoactive properties of human cathepsins K and L. *Eur. J. Biochem.* 270 (2003) 171–178.
- [64] C. Desmazes, F. Gauthier, G. Lalmanach, Cathepsin L, but not cathepsin B, is a potential kininogenase. *Biol. Chem.* 382 (2001) 811–815.
- [65] L. Puzer, J. Vercesi, M.F. Alves, N.M. Barros, M.S. Araujo, M. Aparecida Juliano, M.L. Reis, L. Juliano, A.K. Carmona, A possible alternative mechanism of kinin generation in vivo by cathepsin L. *Biol. Chem.* 386 (2005) 699–704.
- [66] F. Lecaillon, S. Chowdhury, E. Purisima, D. Bromme, G. Lalmanach, The S2 subsites of cathepsins K and L and their contribution to collagen degradation. *Protein Sci.* 16 (2007) 662–670.
- [67] E. Godat, F. Lecaillon, C. Desmazes, S. Duchene, E. Weidauer, P. Saftig, D. Bromme, C. Vandier, G. Lalmanach, Cathepsin K: a cysteine protease with unique kinin-degrading properties. *Biochem. J.* 383 (2004) 501–506.
- [68] F. Veillard, F. Lecaillon, G. Lalmanach, Lung cysteine cathepsins: Intruders or unorthodox contributors to the kallikrein–kinin system? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40 (2008) 1079–1094.
- [69] F. Lecaillon, C. Vandier, E. Godat, V. Herve-Grepinet, D. Bromme, G. Lalmanach, Modulation of hypotensive effects of kinins by cathepsin K. *Arch. Biochem. Biophys.* 459 (2007) 129–136.
- [70] R. Couture, M. Harrisson, R.M. Vianna, F. Cloutier, Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 429 (2001) 161–176.
- [71] D. Regoli, J. Barabe, Kinin receptors. *Methods Enzymol.* 163 (1988) 210–230.
- [72] C. Hecquet, F. Tan, B.M. Marcic, E.G. Erdos, Human bradykinin B(2) receptor is activated by kallikrein and other serine proteases. *Mol. Pharmacol.* 58 (2000) 828–836.
- [73] M. Katori, M. Majima, The renal kallikrein–kinin system: its role as a safety valve for excess sodium intake, and its attenuation as a possible etiologic factor in salt-sensitive hypertension. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 40 (2003) 43–115.
- [74] T. Imamura, J. Potempa, J. Travis, Activation of the kallikrein–kinin system and release of new kinins through alternative cleavage of kininogens by microbial and human cell proteinases. *Biol. Chem.* 385 (2004) 989–996.
- [75] C. Emanueli, P. Madeddu, Targeting kinin receptors for the treatment of tissue ischaemia. *Trends Pharmacol. Sci.* 22 (2001) 478–484.
- [76] J.M. Stewart, Bradykinin antagonists: development and applications. *Biopolymers* 37 (1995) 143–155.
- [77] J.M. Stewart, L. Gera, E.J. York, D.C. Chan, P. Bunn, Bradykinin antagonists: present progress and future prospects. *Immunopharmacology* 43 (1999) 155–161.
- [78] F. Marceau, D. Regoli, Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (2004) 845–852.
- [79] N.D. Rawlings, F.R. Morton, C.Y. Kok, J. Kong, A.J. Barrett, MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 36 (2008) D320–D325.
- [80] V. Turk, B. Turk, D. Turk, Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J.* 20 (2001) 4629–4633.
- [81] K. Brix, A. Dunkhorst, K. Mayer, S. Jordans, Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie* 90 (2008) 194–207.
- [82] C.S. Pillay, E. Elliott, C. Dennison, Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem. J.* 363 (2002) 417–429.
- [83] K. Honey, A.Y. Rudensky, Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003) 472–482.
- [84] M. Yang, Y. Zhang, J. Pan, J. Sun, J. Liu, P. Libby, G.K. Sukhova, A. Doria, N. Katunuma, O.D. Peroni, M. Guerre-Millo, B.B. Kahn, K. Clement, G.P. Shi, Cathepsin L activity controls adipogenesis and glucose tolerance. *Nat. Cell Biol.* 9 (2007) 970–977.
- [85] R.A. Maciewicz, D.J. Etherington, J. Kos, V. Turk, Collagenolytic cathepsins of rabbit spleen: a kinetic analysis of collagen degradation and inhibition by chicken cystatin. *Coll. Relat. Res.* 7 (1987) 295–304.
- [86] D. Bromme, J. Kaleta, Thiol-dependent cathepsins: pathophysiological implications and recent advances in inhibitor design. *Curr. Pharm. Des.* 8 (2002) 1639–1658.
- [87] S. Sasothornsrikul, D. Greenbaum, K.F. Medzihradsky, T. Toneff, R. Bunday, R. Miller, B. Schilling, I. Petermann, J. Dehnert, A. Logvinova, P. Goldsmith, J.M. Neveu, W.S. Lane, B. Gibson, T. Reinheckel, C. Peters, M. Bogoy, V. Hook, Cathepsin L in secretory vesicles functions as a prohormone-processing enzyme for production of the enkephalin peptide neurotransmitter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 9590–9595.
- [88] B. Friedrichs, C. Tepel, T. Reinheckel, J. Deussing, K. von Figura, V. Herzog, C. Peters, P. Saftig, K. Brix, Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L. *J. Clin. Invest.* 111 (2003) 1733–1745.
- [89] F. Lecaillon, J. Kaleta, D. Bromme, Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem. Rev.* 102 (2002) 4459–4488.
- [90] C. Chiellini, M. Costa, S.E. Novelli, E.Z. Amri, L. Benzi, A. Bertacca, P. Cohen, S. Del Prato, J.M. Friedman, M. Maffei, Identification of cathepsin K as a novel marker of adiposity in white adipose tissue. *J. Cell Physiol.* 195 (2003) 309–321.
- [91] Y. Liu, X. Li, D. Peng, Z. Tan, H. Liu, Y. Qing, Y. Xue, G.P. Shi, Usefulness of serum cathepsin L as an independent biomarker in patients with coronary heart disease. *Am. J. Cardiol.* 103 (2009) 476–481.
- [92] S. Taleb, D. Lacasa, J.P. Bastard, C. Poitou, R. Cancello, V. Pelloux, N. Viguerie, A. Benis, J.D. Zucker, J.L. Bouillot, C. Coussieu, A. Basdevant, D. Langin, K. Clement, Cathepsin S, a novel biomarker of adiposity: relevance to atherogenesis. *FASEB J.* 19 (2005) 1540–1542.
- [93] W. Muller-Esterl, H. Fritz, W. Machleidt, A. Ritonja, J. Brzin, M. Kotnik, V. Turk, J. Kellermann, F. Lottspeich, Human plasma kininogens are identical with alpha-cysteine proteinase inhibitors. Evidence from immunological, enzymological and sequence data. *FEBS Lett.* 182 (1985) 310–314.
- [94] M. Abrahamson, A. Ritonja, M.A. Brown, A. Grubb, W. Machleidt, A.J. Barrett, Identification of the probable inhibitory reactive sites of the cysteine proteinase inhibitors human cystatin C and chicken cystatin. *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 9688–9694.

- [95] I. Ohkubo, K. Kurachi, T. Takasawa, H. Shiokawa, M. Sasaki, Isolation of a human cDNA for alpha 2-thiol proteinase inhibitor and its identity with low molecular weight kininogen. *Biochemistry* 23 (1984) 5691–5697.
- [96] P. Lindahl, E. Alriksson, H. Jornvall, I. Bjork, Interaction of the cysteine proteinase inhibitor chicken cystatin with papain. *Biochemistry* 27 (1988) 5074–5082.
- [97] M.T. Stubbs, B. Laber, W. Bode, R. Huber, R. Jerala, B. Lenarcic, V. Turk, The refined 2.4 Å X-ray crystal structure of recombinant human stefin B in complex with the cysteine proteinase papain: a novel type of proteinase inhibitor interaction. *EMBO J.* 9 (1990) 1939–1947.
- [98] B. Turk, V. Turk, D. Turk, Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol. Chem.* 378 (1997) 141–150.
- [99] W. Machleidt, U. Thiele, B. Laber, I. Assfalg-Machleidt, A. Esterl, G. Wiegand, J. Kos, V. Turk, W. Bode, Mechanism of inhibition of papain by chicken egg white cystatin. Inhibition constants of N-terminally truncated forms and cyanogen bromide fragments of the inhibitor. *FEBS Lett.* 243 (1989) 234–238.
- [100] K. Abe, Y. Emori, H. Kondo, S. Arai, K. Suzuki, The NH₂-terminal 21 amino acid residues are not essential for the papain-inhibitory activity of oryzacystatin, a member of the cystatin superfamily. Expression of oryzacystatin cDNA and its truncated fragments in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 7655–7659.
- [101] U. Thiele, I. Assfalg-Machleidt, W. Machleidt, E.A. Auerswald, N-terminal variants of recombinant stefin B: effect on affinity for papain and cathepsin B. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 371 (Suppl.) (1990) 125–136.
- [102] B. Turk, V. Stoka, V. Turk, G. Johansson, J.J. Cazzulo, I. Bjork, High-molecular-weight kininogen binds two molecules of cysteine proteinases with different rate constants. *FEBS Lett.* 391 (1996) 109–112.
- [103] F. Lecaille, D. Bromme, G. Lalmanach, Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie* 90 (2008) 208–226.
- [104] T. Moreau, F. Esnard, N. Gutman, P. Degand, F. Gauthier, Cysteine-proteinase-inhibiting function of T kininogen and of its proteolytic fragments. *Eur. J. Biochem.* 173 (1988) 185–190.
- [105] R. Vogel, I. Assfalg-Machleidt, A. Esterl, W. Machleidt, W. Muller-Esterl, Proteinase-sensitive regions in the heavy chain of low molecular weight kininogen map to the inter-domain junctions. *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 12661–12668.
- [106] E.A. Auerswald, D. Rossler, R. Mentele, I. Assfalg-Machleidt, Cloning, expression and characterization of human kininogen domain 3. *FEBS Lett.* 321 (1993) 93–97.
- [107] K. Ylinenjarvi, T.W. Prasthofer, N.C. Martin, I. Bjork, Interaction of cysteine proteinases with recombinant kininogen domain 2, expressed in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 357 (1995) 309–311.
- [108] G. Lalmanach, J. Hoebeke, T. Moreau, M. Ferrer-Di Martino, F. Gauthier, An immunochromatographic approach to investigating the mechanism of inhibition of cysteine proteinases by members of the cystatin superfamily. *J. Immunol. Methods* 149 (1992) 197–205.
- [109] F. Gauthier, G. Lalmanach, T. Moreau, F. Borrás-Cuesta, J. Hoebeke, Cystatin mimicry by synthetic peptides. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 373 (1992) 465–470.
- [110] L. Verdot, G. Lalmanach, V. Vercruysse, S. Hartmann, R. Lucius, J. Hoebeke, F. Gauthier, B. Vray, Cystatins up-regulate nitric oxide release from interferon-gamma-activated mouse peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 28077–28081.
- [111] L. Verdot, G. Lalmanach, V. Vercruysse, J. Hoebeke, F. Gauthier, B. Vray, Chicken cystatin stimulates nitric oxide release from interferon-gamma-activated mouse peritoneal macrophages via cytokine synthesis. *Eur. J. Biochem.* 266 (1999) 1111–1117.
- [112] P. Carmeliet, Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438 (2005) 932–936.
- [113] P. Carmeliet, Angiogenesis in health and disease. *Nat. Med.* 9 (2003) 653–660.
- [114] B.P. Eliceiri, D.A. Cheresh, Adhesion events in angiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13 (2001) 563–568.
- [115] J. Folkman, Angiogenesis inhibitors generated by tumors. *Mol. Med.* 1 (1995) 120–122.
- [116] M.S. Pepper, Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 8 (1997) 21–43.
- [117] D. Hanahan, J. Folkman, Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86 (1996) 353–364.
- [118] F.X. Maquart, G. Bellon, S. Pasco, J.C. Monboisse, Matrikines in the regulation of extracellular matrix degradation. *Biochimie* 87 (2005) 353–360.
- [119] N. Ortega, Z. Werb, New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *J. Cell Sci.* 115 (2002) 4201–4214.
- [120] V.W. van Hinsbergh, M.A. Engelse, P.H. Quax, Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* 26 (2006) 716–728.
- [121] C.A. Owen, Leukocyte cell surface proteinases: regulation of expression, functions, and mechanisms of surface localization. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40 (2008) 1246–1272.
- [122] M.M. Mohamed, B.F. Sloane, Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6 (2006) 764–775.
- [123] C. Palermo, J.A. Joyce, Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* 29 (2008) 22–28.
- [124] B. Turk, Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (2006) 785–799.
- [125] L. Gillet, S. Roger, P. Besson, F. Lecaille, J. Gore, P. Bougnoux, G. Lalmanach, J.Y. Le Guennec, Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsin-dependent invasiveness and colony growth of human cancer cells. *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 8680–8691.
- [126] J.A. Joyce, A. Baruch, K. Chehade, N. Meyer-Morse, E. Giraudo, F.Y. Tsai, D.C. Greenbaum, J.H. Hager, M. Bogoy, D. Hanahan, Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis. *Cancer Cell* 5 (2004) 443–453.
- [127] V. Gocheva, W. Zeng, D. Ke, D. Klimstra, T. Reinheckel, C. Peters, D. Hanahan, J.A. Joyce, Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev.* 20 (2006) 543–556.
- [128] C. Urbich, C. Heeschen, A. Aicher, K. Sasaki, T. Bruhl, M.R. Farhadi, P. Vajkoczy, W.K. Hofmann, C. Peters, L.A. Pennacchio, N.D. Abolmaali, E. Chavakis, T. Reinheckel, A.M. Zeiher, S. Dimmeler, Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization. *Nat. Med.* 11 (2005) 206–213.
- [129] V. Turk, J. Kos, B. Turk, Cysteine cathepsins (proteases) – on the main stage of cancer? *Cancer Cell* 5 (2004) 409–410.
- [130] C. Lopez-Otin, L.M. Matrisian, Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* 7 (2007) 800–808.
- [131] T. Reinheckel, S. Hagemann, S. Dollwet-Mack, E. Martinez, T. Lohmuller, G. Zlatkovic, D.J. Tobin, N. Maas-Szabowski, C. Peters, The lysosomal cysteine protease cathepsin L regulates keratinocyte proliferation by control of growth factor recycling. *J. Cell Sci.* 118 (2005) 3387–3395.
- [132] O. Vasiljeva, T. Reinheckel, C. Peters, D. Turk, V. Turk, B. Turk, Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr. Pharm. Des.* 13 (2007) 387–403.
- [133] B. Wang, J. Sun, S. Kitamoto, M. Yang, A. Grubb, H.A. Chapman, R. Kalluri, G.P. Shi, Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 6020–6029.
- [134] A.H. Schmaier, K.R. McCrae, The plasma kallikrein–kinin system: its evolution from contact activation. *J. Thromb. Haemost.* 5 (2007) 2323–2329.
- [135] I. Hayashi, H. Amano, S. Yoshida, K. Kamata, M. Kamata, M. Inukai, T. Fujita, Y. Kumagai, S. Furudate, M. Majima, Suppressed angiogenesis in kininogen-deficiencies. *Lab. Invest.* 82 (2002) 871–880.
- [136] D.D. Ku, J.K. Zaleski, S. Liu, T.A. Brock, Vascular endothelial growth factor induces EDHF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am. J. Physiol.* 265 (1993) H586–H592.
- [137] Y. Ikeda, I. Hayashi, E. Kamoshita, A. Yamazaki, H. Endo, K. Ishihara, S. Yamashina, Y. Tsutsumi, H. Matsubara, M. Majima, Host stromal bradykinin B2 receptor signaling facilitates tumor-associated angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res.* 64 (2004) 5178–5185.
- [138] A. Parenti, L. Morbidelli, F. Ledda, H.J. Granger, M. Ziche, The bradykinin/B1 receptor promotes angiogenesis by up-regulation of endogenous FGF-2 in endothelium via the nitric oxide synthase pathway. *FASEB J.* 15 (2001) 1487–1489.
- [139] A.J. Knox, L. Corbett, J. Stocks, E. Holland, Y.M. Zhu, L. Pang, Human airway smooth muscle cells secrete vascular endothelial growth factor: up-regulation by bradykinin via a protein kinase C and prostanoide-dependent mechanism. *FASEB J.* 15 (2001) 2480–2488.
- [140] K. Ishihara, I. Hayash, S. Yamashina, M. Majima, A potential role of bradykinin in angiogenesis and growth of S-180 mouse tumors. *Jpn. J. Pharmacol.* 87 (2001) 318–326.
- [141] J.S. Silvestre, S. Bergaya, R. Tamarat, M. Duriez, C.M. Boulanger, B.I. Levy, Proangiogenic effect of angiotensin-converting enzyme inhibition is mediated by the bradykinin B(2) receptor pathway. *Circ. Res.* 89 (2001) 678–683.
- [142] R.W. Colman, B.A. Jameson, Y. Lin, D. Johnson, S.A. Mousa, Domain 5 of high molecular weight kininogen (kininostatins) down-regulates endothelial cell proliferation and migration and inhibits angiogenesis. *Blood* 95 (2000) 543–550.
- [143] J.C. Zhang, K. Claffey, R. Sakthivel, S. Darzynkiewicz, D.E. Shaw, J. Leal, Y.C. Wang, F.M. Lu, K.R. McCrae, Two-chain high molecular weight kininogen induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis: partial activity within domain 5. *FASEB J.* 14 (2000) 2589–2600.
- [144] J.C. Zhang, X. Qi, J. Juarez, M. Plunkett, F. Donate, R. Sakthivel, A.P. Mazar, K.R. McCrae, Inhibition of angiogenesis by two-chain high molecular weight kininogen (HKA) and kininogen-derived polypeptides. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80 (2002) 85–90.
- [145] J.C. Zhang, F. Donate, X. Qi, N.P. Ziats, J.C. Juarez, A.P. Mazar, Y.P. Pang, K.R. McCrae, The antiangiogenic activity of cleaved high molecular weight kininogen is mediated through binding to endothelial cell tropomyosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (2002) 12224–12229.
- [146] N. Al-Fakhri, T. Chavakis, T. Schmidt-Woll, B. Huang, S.M. Cherian, Y.V. Bobryshev, R.S. Lord, N. Katz, K.T. Preissner, Induction of apoptosis in vascular cells by plasminogen activator inhibitor-1 and high molecular weight kininogen correlates with their anti-adhesive properties. *Biol. Chem.* 384 (2003) 423–435.
- [147] D. Sun, K.R. McCrae, Endothelial-cell apoptosis induced by cleaved high-molecular-weight kininogen (HKA) is matrix dependent and requires the generation of reactive oxygen species. *Blood* 107 (2006) 4714–4720.
- [148] S. Wang, M.G. Hasham, I. Isordia-Salas, A.Y. Tsygankov, R.W. Colman, Y.L. Guo, Upregulation of Cdc2 and cyclin A during apoptosis of endothelial cells induced by cleaved high-molecular-weight kininogen. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284 (2003) H1917–H1923.
- [149] Y.L. Guo, S. Wang, D.J. Cao, R.W. Colman, Apoptotic effect of cleaved high molecular weight kininogen is regulated by extracellular matrix proteins. *J. Cell Biochem.* 89 (2003) 622–632.

- [150] Y. Liu, I.M. Sainz, Y. Wu, R. Pixley, R.G. Espinola, S. Hassan, M.M. Khan, R.W. Colman, The inhibition of tube formation in a collagen-fibrinogen, three-dimensional gel by cleaved kininogen (Hka) and HK domain 5 (D5) is dependent on Src family kinases. *Exp. Cell Res.* 314 (2008) 774–788.
- [151] Y. Liu, D.J. Cao, I.M. Sainz, Y.L. Guo, R.W. Colman, The inhibitory effect of Hka in endothelial cell tube formation is mediated by disrupting the uPA–uPAR complex and inhibiting its signaling and internalization. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295 (2008) C257–C267.
- [152] V. Katkade, A.A. Soyombo, I. Isordia-Salas, H.N. Bradford, J.P. Gaughan, R.W. Colman, T.S. Panetti, Domain 5 of cleaved high molecular weight kininogen inhibits endothelial cell migration through Akt. *Thromb. Haemost.* 94 (2005) 606–614.
- [153] N. Parthasarathy, S.V. Torti, F.M. Torti, Ferritin binds to light chain of human H-kininogen and inhibits kallikrein-mediated bradykinin release. *Biochem. J.* 365 (2002) 279–286.
- [154] L.G. Coffman, J.C. Brown, D.A. Johnson, N. Parthasarathy, R.B. D'Agostino Jr., M.O. Lively, X. Hua, S.L. Tilley, W. Muller-Esterl, M.C. Willingham, F.M. Torti, S.V. Torti, Cleavage of high-molecular-weight kininogen by elastase and trypsin is inhibited by ferritin. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 294 (2008) L505–L515.
- [155] L.G. Coffman, D. Parsonage, R. D'Agostino Jr., F.M. Torti, S.V. Torti, Regulatory effects of ferritin on angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009) 570–575.
- [156] U. Vosgerau, D. Lauer, T. Unger, E. Kaschina, Cleaved high molecular weight kininogen, a novel factor in the regulation of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* (2009).
- [157] Y. Wu, J. Dai, N.G. Schmuckler, N. Bakdash, M.C. Yoder, C.M. Overall, R.W. Colman, Cleaved high molecular weight kininogen inhibits tube formation of endothelial progenitor cells via suppression of matrix metalloproteinase 2. *J. Thromb. Haemost.* (2009).
- [158] Y.L. Guo, S. Wang, R.W. Colman, Kininostatin, an angiogenic inhibitor, inhibits proliferation and induces apoptosis of human endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21 (2001) 1427–1433.
- [159] J. Kaufmann, M. Haasemann, S. Modrow, W. Muller-Esterl, Structural dissection of the multidomain kininogens. Fine mapping of the target epitopes of antibodies interfering with their functional properties. *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 9079–9091.
- [160] H. Herwald, M. Morgelin, H.G. Svensson, U. Sjöbring, Zinc-dependent conformational changes in domain D5 of high molecular mass kininogen modulate contact activation. *Eur. J. Biochem.* 268 (2001) 396–404.
- [161] H.N. Bradford, R.A. DeLa Cadena, S.P. Kunapuli, J.F. Dong, J.A. Lopez, R.W. Colman, Human kininogens regulate thrombin binding to platelets through the glycoprotein Ib–IX–V complex. *Blood* 90 (1997) 1508–1515.
- [162] A.H. Schmaier, Plasma kallikrein/kinin system: a revised hypothesis for its activation and its physiologic contributions. *Curr. Opin. Hematol.* 7 (2000) 261–265.
- [163] F. Mahdi, Z. Shariat-Madar, A. Kuo, M. Carinato, D.B. Cines, A.H. Schmaier, Mapping the interaction between high molecular mass kininogen and the urokinase plasminogen activator receptor. *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 16621–16628.
- [164] Y. Wu, V. Rizzo, Y. Liu, I.M. Sainz, N.G. Schmuckler, R.W. Colman, Kininostatin associates with membrane rafts and inhibits alpha(v)beta3 integrin activation in human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27 (2007) 1968–1975.
- [165] Y. Liu, R. Pixley, M. Fusaro, G. Godoy, E. Kim, M.E. Bromberg, R.W. Colman, Cleaved high-molecular-weight kininogen and its domain 5 inhibit migration and invasion of human prostate cancer cells through the epidermal growth factor receptor pathway. *Oncogene* 28 (2009) 2756–2765.
- [166] Y.T. Wachtfogel, R.A. DeLa Cadena, S.P. Kunapuli, L. Rick, M. Miller, R.L. Schultze, D.C. Altieri, T.S. Edgington, R.W. Colman, High molecular weight kininogen binds to Mac-1 on neutrophils by its heavy chain (domain 3) and its light chain (domain 5). *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 19307–19312.
- [167] A. Barbasz, I. Guevara-Lora, M. Rapala-Kozik, A. Kozik, Kininogen binding to the surfaces of macrophages. *Int. Immunopharmacol.* 8 (2008) 211–216.
- [168] T. Chavakis, S.M. Kanse, F. Lupu, H.P. Hammes, W. Muller-Esterl, R.A. Pixley, R.W. Colman, K.T. Preissner, Different mechanisms define the antiadhesive function of high molecular weight kininogen in integrin- and urokinase receptor-dependent interactions. *Blood* 96 (2000) 514–522.
- [169] K.R. Melo, A. Gutierrez, F.D. Nascimento, M.K. Araujo, M.U. Sampaio, A.K. Carmona, Y.M. Coulson-Thomas, E.S. Trindade, H.B. Nader, I.L. Tersariol, G. Motta, Involvement of heparan sulfate proteoglycans in cellular uptake of high molecular weight kininogen. *Biol. Chem.* 390 (2009) 145–155.
- [170] T. Renne, J. Dedio, G. David, W. Muller-Esterl, High molecular weight kininogen utilizes heparan sulfate proteoglycans for accumulation on endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 33688–33696.
- [171] T. Renne, W. Muller-Esterl, Cell surface-associated chondroitin sulfate proteoglycans bind contact phase factor H-kininogen. *FEBS Lett.* 500 (2001) 36–40.
- [172] T. Mauron, B. Lammle, W.A. Willemin, High molecular weight kininogen is cleaved by FXIa at three sites: Arg409–Arg410, Lys502–Thr503 and Lys325–Lys326. *Thromb. Haemost.* 83 (2000) 709–714.
- [173] V. Gocheva, J.A. Joyce, Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle* 6 (2007) 60–64.
- [174] F.B. Johnson, D.A. Sinclair, L. Guarente, Molecular biology of aging. *Cell* 96 (1999) 291–302.
- [175] B. Friguet, Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *FEBS Lett.* 580 (2006) 2910–2916.
- [176] F. Sierra, G.H. Fey, Y. Guigoz, T-kininogen gene expression is induced during aging. *Mol. Cell Biol.* 9 (1989) 5610–5616.
- [177] F. Sierra, R. Walter, P. Vautravets, Y. Guigoz, Identification of several isoforms of T-kininogen expressed in the liver of aging rats. *Arch. Biochem. Biophys.* 322 (1995) 333–338.
- [178] F. Sierra, S. Coeytaux, M. Juillerat, C. Ruffieux, J. Gaudie, Y. Guigoz, Serum T-kininogen levels increase two to four months before death. *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 10665–10669.
- [179] C. Acuna-Castillo, E. Leiva-Salcedo, C.R. Gomez, V. Perez, M. Li, C. Torres, R. Walter, D.M. Murasko, F. Sierra, T-kininogen: a biomarker of aging in Fisher 344 rats with possible implications for the immune response. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 61 (2006) 641–649.
- [180] R. Walter, D.M. Murasko, F. Sierra, T-kininogen is a biomarker of senescence in rats. *Mech. Ageing Dev.* 106 (1998) 129–144.
- [181] D. Keppler, B. Sordat, F. Sierra, T-kininogen present in the liver of old rats is biologically active and readily forms complexes with endogenous cysteine proteinases. *Mech. Ageing Dev.* 98 (1997) 151–165.
- [182] D. Keppler, R. Walter, C. Perez, F. Sierra, Increased expression of mature cathepsin B in aging rat liver. *Cell Tissue Res.* 302 (2000) 181–188.
- [183] E.R. Stadtman, Protein oxidation and aging. *Science* 257 (1992) 1220–1224.
- [184] V. Perez, E. Leiva-Salcedo, C. Acuna-Castillo, M. Aravena, C. Gomez, V. Sabaj, A. Colombo, S. Nishimura, C. Perez, R. Walter, F. Sierra, T-kininogen induces endothelial cell proliferation. *Mech. Ageing Dev.* 127 (2006) 282–289.
- [185] N. Kopitar-Jerala, The role of cystatins in cells of the immune system. *FEBS Lett.* 580 (2006) 6295–6301.
- [186] B. Vray, S. Hartmann, J. Hoebeke, Immunomodulatory properties of cystatins. *Cell Mol. Life Sci.* 59 (2002) 1503–1512.
- [187] E. Leiva-Salcedo, V. Perez, C. Acuna-Castillo, R. Walter, F. Sierra, T-kininogen inhibits kinin-mediated activation of ERK in endothelial cells. *Biol. Res.* 35 (2002) 287–294.
- [188] C. Acuna-Castillo, M. Aravena, E. Leiva-Salcedo, V. Perez, C. Gomez, V. Sabaj, S. Nishimura, C. Perez, A. Colombo, R. Walter, F. Sierra, T-kininogen, a cystatin-like molecule, inhibits ERK-dependent lymphocyte proliferation. *Mech. Ageing Dev.* 126 (2005) 1284–1291.
- [189] M. Aravena, C. Perez, V. Perez, C. Acuna-Castillo, C. Gomez, E. Leiva-Salcedo, S. Nishimura, V. Sabaj, R. Walter, F. Sierra, T-kininogen can either induce or inhibit proliferation in Balb/c 3T3 fibroblasts, depending on the route of administration. *Mech. Ageing Dev.* 126 (2005) 399–406.
- [190] C. Torres, M. Li, R. Walter, F. Sierra, Modulation of the ERK pathway of signal transduction by cysteine proteinase inhibitors. *J. Cell Biochem.* 80 (2000) 11–23.
- [191] C. Torres, M. Li, R. Walter, F. Sierra, T-kininogen inhibits fibroblast proliferation in the G1 phase of the cell cycle. *Exp. Cell Res.* 269 (2001) 171–179.
- [192] Y.W. Lam, N.N. Tam, J.E. Evans, K.M. Green, X. Zhang, S.M. Ho, Differential proteomics in the aging Noble rat ventral prostate. *Proteomics* 8 (2008) 2750–2763.
- [193] J. Kleniewski, M. Czokalo, Plasma kininogen concentration: the low level in cord blood plasma and age dependence in adults. *Eur. J. Haematol.* 46 (1991) 257–262.
- [194] E. Hack, R.W. Colman, The role of the contact system in the pathogenesis of septic shock. *Sepsis* 3 (1999) 111–118.
- [195] T. Imamura, R.N. Pike, J. Potempa, J. Travis, Pathogenesis of periodontitis: a major arginine-specific cysteine proteinase from *Porphyromonas gingivalis* induces vascular permeability enhancement through activation of the kallikrein/kinin pathway. *J. Clin. Invest.* 94 (1994) 361–367.
- [196] A. Ben Nasr, H. Herwald, U. Sjöbring, T. Renne, W. Muller-Esterl, L. Björck, Absorption of kininogen from human plasma by *Streptococcus pyogenes* is followed by the release of bradykinin. *Biochem. J.* 326 (Pt 3) (1997) 657–660.
- [197] H. Herwald, M. Morgelin, A. Olsen, M. Rhen, B. Dahlback, W. Muller-Esterl, L. Björck, Activation of the contact-phase system on bacterial surfaces – a clue to serious complications in infectious diseases. *Nat. Med.* 4 (1998) 298–302.
- [198] A.B. Ben Nasr, H. Herwald, W. Muller-Esterl, L. Björck, Human kininogens interact with M protein, a bacterial surface protein and virulence determinant. *Biochem. J.* 305 (Pt 1) (1995) 173–180.
- [199] M. Rapala-Kozik, J. Karkowska, A. Jacher, A. Golda, A. Barbasz, I. Guevara-Lora, A. Kozik, Kininogen adsorption to the cell surface of *Candida* spp. *Int. Immunopharmacol.* 8 (2008) 237–241.
- [200] M. Rasmussen, L. Björck, Proteolysis and its regulation at the surface of *Streptococcus pyogenes*. *Mol. Microbiol.* 43 (2002) 537–544.
- [201] K.A. Brogden, J.M. Guthmiller, M. Salzet, M. Zasloff, The nervous system and innate immunity: the neuropeptide connection. *Nat. Immunol.* 6 (2005) 558–564.
- [202] E. Andersson, V. Rydengard, A. Sonesson, M. Morgelin, L. Björck, A. Schmidtchen, Antimicrobial activities of heparin-binding peptides. *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 1219–1226.
- [203] I.M. Frick, L. Björck, H. Herwald, The dual role of the contact system in bacterial infectious disease. *Thromb. Haemost.* 98 (2007) 497–502.
- [204] R. Bals, J.M. Wilson, Cathelicidins – a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol. Life Sci.* 60 (2003) 711–720.
- [205] T. Chavakis, S.M. Kanse, R.A. Pixley, A.E. May, I. Isordia-Salas, R.W. Colman, K.T. Preissner, Regulation of leukocyte recruitment by polypeptides derived from high molecular weight kininogen. *FASEB J.* 15 (2001) 2365–2376.

- [206] A.A. Hasan, D.B. Cines, H. Herwald, A.H. Schmaier, W. Muller-Esterl, Mapping the cell binding site on high molecular weight kininogen domain 5. J. Biol. Chem. 270 (1995) 19256–19261.
- [207] S. Oehmcke, O. Shannon, M. von Kockritz-Blickwede, M. Morgelin, A. Linder, A.I. Olin, L. Bjorck, H. Herwald, Treatment of invasive streptococcal infection with a peptide derived from human high-molecular weight kininogen. Blood 114 (2009) 444–451.
- [208] K. Persson, M. Morgelin, L. Lindbom, P. Alm, L. Bjorck, H. Herwald, Severe lung lesions caused by *Salmonella* are prevented by inhibition of the contact system. J. Exp. Med. 192 (2000) 1415–1424.
- [209] M. Pasupuleti, A. Chalupka, M. Morgelin, A. Schmidtchen, M. Malmsten, Tryptophan end-tagging of antimicrobial peptides for increased potency against *Pseudomonas aeruginosa*. Biochim. Biophys. Acta 1790 (2009) 800–808.
- [210] A. Schmidtchen, M. Pasupuleti, M. Morgelin, M. Davoudi, J. Alenfall, A. Chalupka, M. Malmsten, Boosting antimicrobial peptides by hydrophobic oligopeptide end tags. J. Biol. Chem. 284 (2009) 17584–17594.
- [211] M. Pasupuleti, A. Schmidtchen, A. Chalupka, L. Ringstad, M. Malmsten, End-tagging of ultra-short antimicrobial peptides by W/F stretches to facilitate bacterial killing. PLoS One 4 (2009) e5285.

Cysteine Cathepsins: Markers and Therapy Targets in Lung Disorders

Mariana Kasabova · Ahlame Saidi ·
Clément Naudin · Juliette Sage · Fabien Lecaille ·
Gilles Lalmanach

Published online: 9 June 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract There is now growing evidence that lung cysteine cathepsins take part in several biological processes and pulmonary homeostasis, although their exact functions remain to be clarified. Their production is increased in most tumors and in chronic and acute inflammatory lung disorders such as silicosis, COPD (emphysema, chronic bronchitis), asthma, and bronchopulmonary dysplasia. Cathepsins aggravate the extent and severity of inflammation and contribute to the remodeling and/or degradation of the extracellular matrix and the basement membrane. Cysteine cathepsins and their inhibitors (stefins and cystatins) are both potential markers of the prognosis and diagnosis of cancer. Cathepsin S is a potential marker of asthma, while cathepsin K may be a useful immunohistological marker of lymphangioleiomyomatosis and of granulomas in interstitial lung diseases. This review covers selected aspects of our current knowledge about lung cysteine cathepsins and outlines some recent advances. We also examine the implications of using cathepsin inhibitors to treat a variety of bone and joint diseases like rheumatoid arthritis, osteoporosis, and bone metastasis for the risk of deleterious side effects on the lungs.

Keywords Arthritis · Asthma · Bone disease · Cathepsin · Chronic obstructive pulmonary disease · Cysteine protease · Emphysema · Fibrosis · Osteoporosis · Protease inhibitor

Introduction

Papain-like cysteine cathepsins related to the family C1, eleven cysteine cathepsins for the human genome: cathepsins B, H, L, S, C, K, O, F, V, X (also called Z/P) and W [1], have long been thought to be primarily involved in end-stage breakdown of endocytosed proteins within lysosomal “suicide bags”. But cathepsins may be involved in cellular pathways other than the endocytic pathway [2]. They have been found in the pericellular environment as soluble enzymes or associated with cell surfaces [3] and also in nuclei [4]. We will not discuss their genomic organization and regulation, folding and structural features (catalytic domains have very similar sequences and three-dimensional arrangements; see MEROPS: the peptidase database: <http://merops.sanger.ac.uk>), catalytic mechanism, substrate specificity, or zymogen activation, since they have been detailed elsewhere [5–8]. The regulation of their proteolytic activity by their natural inhibitors has also been covered [9–12]. Cysteine cathepsins contribute to specialized processes such as histone proteolysis during embryonic stem cell differentiation [13], the processing of peptide neurotransmitters [14], hair cycle control [15], maturation of thyroid hormones [16], antigen presentation [17], and apoptosis [18]. Cysteine cathepsins are also involved in a broad spectrum of disorders, e.g., atherosclerosis, adiposity, angiogenesis, tumor invasion, and pulmonary hypertension (see reviews [6, 19–23]), making

M. Kasabova · A. Saidi · C. Naudin · J. Sage · F. Lecaille ·
G. Lalmanach (✉)
INSERM U618, Protéases et Vectorisation Pulmonaires,
Equipe Protéases et Pathologies Pulmonaires, Faculté de
Médecine, Université François Rabelais, 10 Boulevard Tonnellé,
37032 Tours cedex, France
e-mail: gilles.lalmanach@univ-tours.fr

J. Sage
Département Sciences du Vivant, LVMH Recherche, Saint Jean
de Braye, France

them putative targets for the development of new treatments [24–26].

Most of the efforts of pharmaceutical industry have been focusing on the roles of cysteine cathepsins, particularly cathepsins S and K, in musculoskeletal and bone diseases [27]. Cathepsin K displays a highly potent collagenase activity toward the two main connective tissue collagens types I and II [8]. Cathepsin K that is predominantly expressed in osteoclasts has been identified as a critical bone resorbing protease; rapidly numerous pharmaceutical companies have focused on the design of antiresorptive antiproteases directed toward cathepsin K for the treatment of osteoporosis and bone diseases including metastasis (for example [28, 29]). Otherwise cathepsin S knockout mice exhibit decreased susceptibility to experimental arthritis [30]. Cathepsin S, which is heavily expressed in synovial macrophages in rheumatoid arthritis joints and secreted into the cartilage matrix, is a weak collagenase but is a potent proteoglycan-degrading enzyme and aggrecanase. Subsequently, companies have also focused on the development of cathepsin S inhibitors for inflammatory diseases, and especially of joint diseases including rheumatoid arthritis [27, 31].

On the other hand, pulmonary cysteine cathepsins play a significant role in both normal lung homeostasis and respiratory disorder, but only a few specialized reviews devoted to their putative functions have been published [32–36]. Here, we will examine the novel functions of lung cysteine cathepsins that have been proposed/discovered in addition to the conventional ones like ECM degradation. Then, we will briefly discuss the potential side effects on lung of using cathepsin inhibitors to treat skeletal and bone diseases.

Distribution Patterns in Normal Lung

Immunohistochemical analysis indicate that ubiquitous cathepsins B, H, and L, and to a lesser extent cathepsin X, are distributed and expressed roughly in most of lung tissues and cells. Cathepsins B and L are primarily found in bronchial epithelial cells (Table 1), which represent the first cells of the lung to be in contact with the environment, and in macrophages [37]. Also, the aminopeptidase cathepsin H is expressed mostly in macrophages and bronchial epithelial cells and found in significant amounts in type II pneumocytes, while cathepsin C is mainly located in type II alveolar epithelial cells [38]. Cathepsin W is found in macrophages, and also in some lymphocytes, while mouse lung alveolar macrophages contain large amounts of cathepsin F [39]. Cathepsins X and S are mainly expressed in macrophages. Cathepsin K is present in bronchial and alveolar epithelial cells and in

Table 1 Expression of cysteine cathepsins in lung tissues

Cathepsins	Cell type
B	Ubiquitous, bronchial epithelial cells, macrophages
C	Type II alveolar epithelial cells
F	Mouse lung alveolar macrophages
H	Ubiquitous, type II epithelial cells, macrophages
K	Macrophages, bronchial epithelial cells
L	Ubiquitous, bronchial epithelial cells, macrophages
S	Macrophages
X	Ubiquitous, macrophages
W	Macrophages, lymphocytes

macrophages and was also detected in perivascular cells by in situ hybridization [8, 37, 40]. Type II pneumocytes synthesize increased amounts of cathepsin H during differentiation, while cathepsin K is strongly expressed in the cells of the upper epithelial layers in the human embryo and fetal tissue extracts, suggesting a potential role in the developmental process [41]. In addition, the presence of cathepsin S on the surface of ciliated cells of the normal human lung could favor the motility of their cilia and protect the airways by impairing the binding of plasma-derived proteins that leads to dysfunctional ciliary motion [19].

Cysteine Cathepsins in Normal Lung Homeostasis

Matrix Remodeling of the Lung

The pulmonary extracellular matrix (ECM) that contains a mixture of proteoglycans, collagens, and elastin is subjected to a continuous turnover (approximately more than 10% of total ECM is recycled per day; [42]). This proteolytic turnover requires the combined action of intracellular and extracellular proteases of different classes. First, collagens are extracellularly degraded by collagenases, gelatinases, and stromelysin, then are phagocytosed by fibroblasts and macrophages for complementary degradation in acidic compartments. In addition to intracellular degradation of lung collagens, extracellular cathepsins B, L, S, and K can also participate in the degradation of matrix proteins [6]. While cathepsin S displays the highest pH stability, extracellular proteolysis may be also promoted by direct acidification of the pericellular space, and it has been demonstrated that monocyte-derived macrophages adhere tightly to elastin particles and form a sequestered acid microenvironment [43]. Cathepsin K encompasses a unique collagenolytic activity among cathepsins since it degrades fibrillar collagens I and II within covalently cross-linked triple helices, while cathepsin L cleaves only in their

nonhelical telopeptide regions [44, 45]. Besides these collagenolytic properties, elastinolytic activities of cathepsins appear also to be essential for matrix remodeling in the lungs. Besides cathepsin V, cathepsins K, L, and S are potent elastases, displaying elastinolytic activities higher than the activities of neutrophil elastase and metalloelastase [46, 47].

Cathepsins in Antigen Presentation

Antigen presentation leads to the display of peptides on major histocompatibility complex (MHC) class II molecules at the surface of antigen-presenting cells. This pathway involves two major steps: invariant chain (Ii) hydrolysis and antigen processing. Cysteine cathepsins not only help breakdown of Ii from class II-Ii complexes, they also mediate the processing of antigens [48–50]. Most data on their immunoregulatory function have been obtained through experiments with transgenic mice, despite the fact that specific functions of cathepsins in mice are not necessarily identical in humans [51]. For instance, mouse genome does not contain a cathepsin V gene, while cathepsin V replaces cathepsin L in human thymus [52]. Despite this limitation, it is acquired that lysosomal cathepsins, in particular cathepsins L and S, have a predominant role in regulating antigen presentation, processing, and peptide loading [17, 53–55]. Cathepsin F, which is expressed in large amounts in lung alveolar macrophages, was also proposed to play a pivotal role in Ii processing and class II peptide loading, and regulation of immunoglobulin E response [56]. Consequences of pharmacological inhibition of cathepsin S and genetic ablation of cathepsin F will be further discussed (section: cathepsins and asthma). Potential functions of cathepsins B and K in antigen-presenting cells of the lungs need to be explored in more detail [39].

Processing of Surfactant Proteins

Lung epithelium assures gas exchange in the alveoli and protects from pathogens and pollutants present within inhaled air. These two functions are facilitated by secretions, mucus in the upper airways, and pulmonary surfactant in the alveoli [57]. The main function of pulmonary surfactant, which is a mixture of lipids and specific proteins and is secreted by the type II pneumocytes, is the reduction of surface tension at the air–liquid interface, thus preventing alveolar collapse [58]. Surfactant proteins are classified as hydrophilic (SP-A and SP-D) and hydrophobic (SP-B and SP-C) proteins. Primarily, SP-B and SP-C that are associated with the surfactant modulate biophysical properties of surfactant. On the other hand, lung SP-A and SP-D that are produced by alveolar type II epithelial cells

and by Clara cells are also essential components of the innate immunity [59]. Both are collectins and thus possess a C-terminal calcium-dependent carbohydrate recognition domain (e.g., lectin-like domain) and a collagen-like N-terminal domain [60, 61]. Interferon-gamma (IFN- γ) increases both mRNA and protein levels of SP-D and slightly increases the mRNA levels of SP-A; alternatively, IFN- γ reduces the level of the active form of cathepsin H [62]. Following cleavage of hydrophilic SP-D by neutrophil-derived serine proteases (neutrophil elastase, proteinase-3, and cathepsin G) [63], the ability of SP-D to promote bacterial aggregation and to bind to yeast mannan is markedly reduced [64]. Similarly, cysteine cathepsins participate in the regulation of the microbicidal activity of SP-A (Lecaille, Naudin and Lalmanach, unpublished data). Otherwise hydrophobic SP-B and SP-C that are synthesized as proproteins (proSP-B and proSP-C) are N- and C-terminally processed in multivesicular bodies and lamellar bodies of type II pneumocytes. They colocalize with cathepsin H that is upregulated during differentiation of human fetal type II pneumocytes [65]. Treatment with L-3-carboxy-trans-2,3-epoxy-propionyl-leucylamide-(4-guanido)-butane (E-64) impairs SP-B processing, supporting that cysteine cathepsins are required for SP-B maturation [65]. The protein levels of mature SP-B are decreased by IFN- γ treatment, likely due to the reduction in active cathepsin H [62]. Also, cathepsin H participates in the N-terminal processing of proSP C [66]. Nevertheless, napsin A, an aspartyl protease, and probably one other enzyme that is not yet known are involved in the generation of mature SP-C [67, 68].

Cathepsins and Lung Cancer

Cysteine cathepsins are abundant in malignant tumors and are secreted into the extracellular medium. Changes in their production, their activity, and their aberrant locations have led to them being implicated in cancer progression [69, 70]. There may be altered trafficking and/or localization in several tumor types. While cysteine cathepsins are usually located in the endosomal/lysosomal compartments in normal cells, mature cathepsins as well their proforms may be redistributed to the cell surface during cancer progression and may be found in the pericellular environment as soluble enzymes or bound to cell surface receptors at the plasma membrane [2], colocalizing with tetraspanin CD63, annexin II, or pro-urokinase plasminogen activator [71–73]. The pH-dependent proteolytic activity of extracellular cysteine proteases is also increased by the acidification of the pericellular microenvironment of tumor cells. This points to a link between the invasiveness of malignant cells and their capacity to degrade basement membranes and

extracellular matrices [74–76]. The increased concentrations and enzymatic activities of cathepsins B and L, the most intensively investigated cathepsins, have been correlated with malignant progression, angiogenesis, and cancer-associated inflammation [21, 23], as demonstrated by molecular imaging using a cathepsin-activatable optical probe [77]. Relationships between the deregulation of cysteine cathepsins and cancer progression have been established through pharmacological inhibition or by studies with mutant knockout mice, and an emerging body of evidence indicates that these enzymes are valid targets for effective antitumor drugs [24, 69]. Deletion of the genes encoding cathepsins B, C, L, or S has demonstrated that the roles of cathepsins partly overlap. Cathepsin B is involved in tumor formation and development, growth and invasion, while cathepsin S participates in tumor formation and invasion, and cathepsin L participates in tumor growth and invasion [25, 78] (Table 2).

The deleterious effects of cysteine cathepsins were confirmed by a functional analysis of their natural inhibitors. For instance, fibrosarcoma lung metastases were extensively reduced by the overproduction of adenovirus-mediated cystatin C [79], while cystatin M delayed the tumor growth and reduced the burden of lung metastases [80]. High concentrations of stefin A were found in lung cancer, and these may counterbalance the excess activity of cysteine cathepsins (for review, [81]) and overproduction of stefin A may inhibit tumor cell growth, angiogenesis,

invasion, and metastasis [82]. The change in the cellular location of cysteine cathepsins during tumorigenesis may have positive implications for the therapeutic efficacy of cysteine cathepsin inhibitors. Inhibitors that cannot pass through the plasma membrane could target selectively cell surface or secreted cysteine cathepsins, but not the intracellular cysteine cathepsins in normal cells, thereby minimizing toxicity and side effects. Targeting secreted cathepsin S with an inhibitory antibody hindered tumor development by blocking its invasive and proangiogenic effects [83, 84], while a polyclonal anti-cathepsin L antibody, which acts extracellularly, significantly decreased lung metastases in nude mice [85]. Nevertheless, the biological roles of cathepsins must be thoroughly documented before anti-cathepsin drugs can be used for chemotherapy, and the strategy must be adapted to the type of cancer to be targeted because cysteine cathepsins may also be protective, as was demonstrated by Reinheckel et al. (2005) [86] in squamous skin carcinomas. Abnormally active protein kinase B/Akt and mitogen-activated protein kinase pathways in cathepsin L-deficient keratinocytes were recently reported; indicating, once again, that cysteine cathepsins may also act as antitumor proteases [87].

While some discrepant results have been reported, elevated concentrations and/or activities of cathepsins are usually correlated with a poor patient prognosis, and cysteine cathepsins and their endogenous inhibitors have been proposed as markers for both prognosis and diagnosis

Table 2 Cysteine cathepsins in lung disorders : a short summary

Lung diseases	Cathepsins	Putative functions
Asthma	F	Degradation of invariant chain (MHC II peptides), processing of antigens in the absence of Cats S and L.
		Development of eosinophilia in mouse lung
BPD	S	Asthma biomarker
	K	Extracellular collagen deposition
		Induction of fibrotic changes in newborn infants with BPD
Cancer	S	Degradation of extracellular components, elastinolysis
	B,H,L,S,X	Tumor formation, growth, proliferation, and angiogenesis
		Prognosis and diagnosis markers
COPD (emphysema)	B,F,K,S,L,V	Degradation of elastin/collagens
		Inactivation of SLPI by Cat L
		Regulation of ozone-induced AHR and inflammation by Cat S
Cystic fibrosis	B,H,L,S	Inactivation of endogenous SLPI, degradation of antimicrobial proteins, favoring bacterial infection and colonization
Lymphangioleiomyomatosis	K	Marker for diagnosis (immunohistochemistry)
Pulmonary alveolar proteinosis	B,H,L,S	Reservoir of mature enzymes
Sarcoidosis	K	Cat K deficiency involved in the development of lung granulomas
	L,S	Impairment/suppression of granulomas in absence of Cats L and S
Silicosis	B,H,K,L,S	Participation of Cat K in pulmonary homeostasis, protective role against fibrosis

[88–90]. The concentrations of these enzymes are accurate predictors of life expectancy and may be reasonably valuable markers for assessing the risk of relapse and/or death for cancer patients [91]. Early studies showed that an increase in cathepsin L activity [92] signified a poor prognosis for breast and lung cancer patients. Conversely, patients suffering from non-small-cell lung cancer with high concentrations of stefin A and stefin B had a better chance of survival, while cystatins C and E/M provided no prognostic information [93].

Cathepsins and Lung Inflammation

Due to their proinflammatory properties resulting from plasma extravasation, activation of mast cells, fibroblasts, and macrophages, and the release of various mediators, human kinins (e.g., bradykinin and lysyl-bradykinin) are believed to play an important role in lung inflammation. Kinins are primarily released from kininogens by plasma and tissue kallikreins and their pharmacological effects are mediated by bradykinin (BK) receptors [94]. However, other unconventional proteolytic pathways have been proposed (see for review: [36]). While cathepsin B cleaves kininogens but does not generate kinins [95, 96], cathepsin L may act as kininogenase, suggesting that this could represent an alternative pathway for kinin production [95, 97, 98]. Otherwise cathepsin K has an opposite effect: cathepsin K cleaves kinins, releases pharmacologically inactive kinin-derived metabolites, and impairs bradykinin B2 receptor-mediated contraction of bronchial smooth muscles of normal and chronic hypoxic rats [99]. Kininase properties of cathepsin K were confirmed in a rodent model, since the enzyme reduces the hypotensive effect of bradykinin by attenuating kallikrein-induced decrease of blood pressure [100]. Whereas bradykinin induces bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness in asthmatic patients, pharmacological antagonists of BK receptors (e.g., Icatibant) reduce bronchoconstriction and improve their pulmonary function [101]. Accordingly, the ability of cathepsin K to degrade kinins and subsequently to impair the activation of BK receptors may also attenuate bronchoconstriction during airway obstructive diseases [36].

Cathepsin L was reported as a possible interleukin-8 (IL-8) converting enzyme. In response to external stimuli, cathepsin L is secreted from human fibroblasts and may participate in IL-8 processing [102]. On the other hand, while the production of IL-6, IL-18, and transforming growth factor-beta (TGF-beta1/2) remain unchanged, cathepsin L-deficient epithelial cells secrete five- to eightfold more IL-8 than normal A549 cells, supporting that suppression of cathepsin L expression leads to an upregulation of IL-8 production [103]. In addition, Bühling

and coworkers suggested that lung cathepsin K may be a marker of macrophage differentiation and inflammation [104]. The probable and specific role of cathepsins in chronic and acute inflammatory lung pathologies will be developed in the paragraphs below.

Cathepsins and COPD (Emphysema, Chronic Bronchitis)

The main characteristic of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) that is primarily due to tobacco smoking is chronic inflammation of the pulmonary tissue. Surprisingly, little is known about the underlying pathogenetic mechanisms of this systemic inflammatory disease [105]. While protease inhibitors are normally in a homeostatic balance with proteases, their inactivation or degradation in the pulmonary tissue leads to a loss of control of proteolytic activities in the lung. A hallmark of COPD is that acute inflammation switches to chronic persistent inflammation and subsequently to a persistent tissue injury caused by the release of reactive oxygen species (ROS) and proteases by activated neutrophils and macrophages [106]. The remodeling and degradation of major components of the pulmonary extracellular matrix (ECM) and the basement membrane depend on serine proteases and metalloproteases, but cysteine cathepsins also contribute [6, 107]. Breakdown of the elastin fibers that confer elasticity of the lung blood vessels and pulmonary tissues is closely associated with emphysema [3]. Cathepsins B, F, K, L, S, and V all have elastinolytic activity [47]. Macrophages degrade elastin both extracellularly and intracellularly. Cathepsins K and S are mostly involved in extracellular degradation, while cathepsin V is mostly concerned with lysosomal digestion [46]. Extracellular cysteine cathepsins released from macrophages are found in emphysematous bronchoalveolar lavage fluids (BALFs) [108] and may contribute to the excessive degradation of elastin and collagens that occurs in emphysema [6]. Proteolysis may also be favored by the tight adherence of macrophages to fibers, where they form a closed, acidified environment [43].

Guinea pigs exposed to cigarette smoke have increased phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein (MAP) kinases. Inflammation and emphysematous changes were associated with a decrease in elastin and collagen in the alveolar wall, and a threefold increase in cathepsin K activity in the lungs [109]. Cigarette smoke is also a powerful stimulator and activator of the IL-18 pathway in wild-type mice, and the concentrations of IL-18, MMP 12 and both cathepsins S and B are increased in the pulmonary macrophages of patients with chronic obstructive lung disease. Conversely, emphysema as well

the concentration of cathepsin S mRNA are markedly decreased in IL-18R knockout mice that have been exposed to cigarette smoke [110]. Exposure to IL-10 prevents the conversion of procathepsin S to its mature form, while IL-13 has been shown to stimulate the synthesis of cathepsin S as well cathepsins B, H, K, and L [111, 112]. Both pharmacological inhibition and a null mutation of cathepsin S decreased inflammation and lung volumes in a model of emphysema induced by the overproduction of IFN-gamma [113]. Ozone also seems to aggravate the symptoms of patients with COPD and asthma. Exposure to ozone increases the responsiveness and inflammation of airways, the number of BAL inflammatory cells and the concentrations of cathepsin S, cytokine IL-6, TNF- and IFN-. Inhibiting cathepsin S reduces the concentrations of IL-6 and TNF-, indicating that cathepsin S could be a target in the treatment of oxidative stress-induced airway hyper-responsiveness (AHR) and inflammation [114]. Macrophages incubated with COPD BALFs produce higher levels of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), a potent inhibitor of neutrophil elastase that also suppresses LPS-induced activation of NF- κ B, nitric oxide production, and TNF- [115]. SLPI can also inhibit IFN- γ -induced cathepsin S production by macrophages [116]. On the other hand, cathepsin L from emphysema epithelial lining fluid might cleave SLPI, so decreasing the concentration and activity of SLPI [117]. Toll-like receptor 4 (TLR 4)-deficient mice have been shown to develop emphysema as they age. But the proteases and antiproteases implicated in the pathogenesis of emphysema (e.g., MMPs, cathepsins) were unaltered, suggesting that an unidentified protease is responsible for the degradation of elastin that occurs in the lungs of TLR 4 $^{-/-}$ mice [118].

Potential Role of Cathepsins in the Pathogenesis of Silicosis

The lungs of animal models of silicosis contain macrophage aggregates, proliferating lymphocytes and alveolar type II cell hyperplasia. The lungs of monkeys (*Macacus cynomolgus*) exposed to quartz aerosols released increased amounts of superoxide anion and had increased concentrations of α 1-Pi and lysosomal glycosidases [119]. And the inflammatory and adaptive immune responses, including T-cell hyperresponsiveness, were also amplified [120], while activated alveolar macrophages secreted massive amounts of chemotactic factors and lysosomal enzymes leading to fibrotic responses and tissue damage [121]. The cysteine cathepsins may act together with MMP-2 (gelatinase A), MMP-9 (gelatinase B), and stromelysin to cause the subsequent disruption of the basement membrane [38, 122, 123].

Considerable interest has focused on cathepsin K and its role in pulmonary homeostasis [8, 36]. Lung cathepsin K is primarily produced by pulmonary macrophages and fibroblasts. The finding that cathepsin K null mice accumulate more collagen than do wild-type mice has led to the proposal that it helps protect the lungs against fibrosis by counteracting the increased matrix deposition [34]. The transcription of lung cathepsin K was increased by instilling crystalline silica particles and the cathepsin K activity in homogenates of silicotic lungs was higher than in control lungs [124]. The concentrations of cathepsin K transcripts were also higher in the lungs of silica-resistant (BALB/c strain) mice than in the lungs of silica-sensitive (C57BL/6) littermates when both groups of mice were exposed to silica particles [124]. Mature cathepsins B, H, K, L and S, but not their proforms, have been found in human BAL fluids from patients with chronic silicosis [125]. The aminopeptidase cathepsin H is the most profuse of the cysteine cathepsins studied, while cathepsins B and L are the two most abundant endoproteases. The overall concentration of active cathepsins B, H, K, L, and S is approximately ten-fold lower than their concentration in BAL fluid supernatants from patients suffering from inflammatory acute lung injuries (for review: [35]).

Cathepsins and Cystic Fibrosis

The activities of cathepsins B, L, H, and S are higher in the lung secretions from patients with CF than in those from healthy individuals [126]. Both active cathepsin B and cathepsin S were found to be correlated with each other and also with the levels of neutrophil elastase and IL-8 [127]. The low pH (below 6.0) of the epithelium lining fluid in CF also provides optimal conditions for cathepsin activity [128]. Cathepsins are not only responsible for the breakdown of ECM components and local tissue damage, they also contribute to the dysfunction of the inflammatory response by reducing the host antimicrobial defenses by inactivating endogenous SLPI and breaking down antimicrobial proteins and peptides like beta-defensins and lactoferrin. They thus favor infection and colonization by opportunistic pathogens [129–131]. Nevertheless, human cysteine cathepsins, conversely to neutrophil elastase, are not consistent markers of infection for patients colonized by *Pseudomonas aeruginosa* (Naudin, Lecaille & Lalm-anach, unpublished data).

Delivering antiproteases directly to the lung via inhalation improves their targeting to their sites of action so that their effective half-life is longer than that of antiproteases given intravenously. One of the potential agents for treating CF is alpha-1 antitrypsin, a member of the serpin family of serine protease inhibitors. It is cleaved by

cathepsin L [132]. The success of inhaled rSLPI therapy is limited by its rapid clearance and extensive degradation by proteases, particularly cathepsins [133]. Nevertheless, rSLPI has been successfully delivered by aerosol, and the results are promising [134, 135]. The inflammation of the airways of CF patients may be decreased by inhibiting neutrophil elastase and reducing the IL-8 concentration [136]. A liposome-encapsulated rSLPI that is more resistant to cathepsin L inactivation was recently described for inhalation therapy [133, 137]. Inhibiting elastase with aerosolized alpha-1 antitrypsin also partly blocks elastase-induced cathepsin B activity [138].

Cathepsins and BPD

Bronchopulmonary dysplasia (BPD) is a chronic pulmonary disease that develops in very low birth weight infants who have been on prolonged ventilation. While survival rates have improved considerably in recent years, BPD continues to be a significant disease of premature infants. BPD babies suffer from impaired alveolar and capillary development and growth, reactive airway disease, and respiratory infections [139]. An imbalance between proteases (neutrophil elastase, metalloproteinases MMP-2 and MMP-9) and their inhibitors has been implicated in the pathogenesis of BPD, including increased elastase activity, reduced elastase inhibitory activity in the airway secretions and an abnormal pattern of elastin production [140, 141]. An imbalance between cysteine cathepsins and their inhibitors was also identified in a baboon model of BPD. All the cathepsins, except cathepsin K, were found in macrophages, and their proteolytic activity in the lung tissues and BAL fluids of BPD baboons was significantly higher than in the controls, while concentrations of stefin B and cystatin C remain normal [40]. The decreased cathepsin K concentration in the lungs of newborn infants with BPD is accompanied by the increased deposition of extracellular collagen, suggesting that cathepsin K is directly associated with the development of lung fiber [142]. Newborn wild-type and cathepsin S-deficient mice exposed to 80% oxygen for 14 days demonstrated the deleterious effect of cathepsin S in BPD. The knockout (KO) mice exposed to hyperoxia did not suffer from growth restriction and had improved alveolarization, thinner septal walls and little elastin damage [143]. Inflammation leads to an increase in cathepsin S as monocytes enter alveolar spaces [144], and this enzyme may be involved in regulating the inflammatory response in BPD. Cathepsin S could facilitate the recruitment of fibroblasts to the interstitium by breaking down extracellular components and inactivating antifibrotic molecules like IFN-. While this idea remains to be validated, Catatelpé and

coworkers have suggested that a feedback loop between IFN- and cathepsin S could play a pivotal role in maintaining the balance between fibrotic and antifibrotic factors in the lung [143].

Cathepsins and Asthma

Asthma is a chronic inflammatory disease of the lungs whose main characteristics are airway hyperreactivity and mucus hypersecretion leading to obstruction of airflow. Treatment with E-64 in a mouse ovalbumin model of human asthma led to a significant reduction in the number of eosinophils and lung weight [145]. Inhaling aerosolized ovalbumin markedly increased the concentrations of cathepsin S, suggesting that cathepsin S is a marker of inflamed tissues [146], while mice treated with a cathepsin S inhibitor have an attenuated antibody response to ovalbumin. Administration of methylprednisolone, a corticosteroid, for 1 week resulted in a lower serum cathepsin S concentration, while the immunosuppressant drug, cyclosporin A, had no effect. As a result, cathepsin S has been proposed as an additional biological marker of asthma for monitoring the extent of disease and response to therapy [147]. Imaging in vivo (by fluorescence molecular tomography) revealed that the cysteine protease activity in the lungs of asthmatic BALB/c mice that had been sensitized with ovalbumin was associated with the inflammatory eosinophilia. The cathepsin activities decreased in vivo and in vitro in response to dexamethasone treatment [148]. Treating a mouse model of pulmonary hypersensitivity with a cathepsin S inhibitor blocked the infiltration of eosinophils into the lung [55] and reduced oxidative stress-induced AHR and inflammation due to exposure to ozone [114]. Nevertheless, Shi and colleagues found that large amounts of cathepsin F were produced by mouse lung alveolar macrophages and that its genetic impairment prevented eosinophilia in the lungs and the immunoglobulin E response after ovalbumin challenge, while cathepsin S remained unchanged [56]. It was confirmed recently that inhibiting cathepsin S prior to triggering airway inflammation reduces the response and so could be beneficial in airway disease. Genetic and pharmacological studies both indicate that cathepsin S is involved the development of the allergic response [149]. Thus, the selective inhibition of cathepsin S may be a way of treating asthma and autoimmune diseases despite the fact that its specific role and mechanism of action are still not clear. Some cathepsin S inhibitors are currently in preclinical trials for treating bronchial asthma [25]. Cathepsin F also helps regulate the processing of the invariant chain that is associated with the major histocompatibility complex (MHC) class II. Hence, specific inhibitors of cathepsin F may be useful in treating

diseases involving inappropriate or excessive immune responses [150].

Cathepsins and Rare Pulmonary Diseases

Cathepsins and Lymphangioleiomyomatosis

Lymphangioleiomyomatosis is a rare, progressive cystic disease (estimated prevalence of 1–9/1,000,000) that affects the lungs of women, usually of premenopausal age (mean survival time: 10–20 years; Orphanet: <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>). Lymphangioleiomyomatosis is associated with abnormalities affecting the lung parenchyma and caused by progressive infiltration by smooth muscle cells that mainly produce contractile proteins (α -smooth muscle actin and desmin). Immunohistochemical studies have demonstrated strong cathepsin K immunoreactivity in all lymphangioleiomyomatosis cases that is restricted to lymphangioleiomyomatosis cells [151]. The situation is similar in renal angiomyolipomas, indicating that cathepsin K may be a useful new marker for identifying lymphangioleiomyomatosis, which is still often misdiagnosed. Intense immunostaining for cathepsin K has also been found in epithelioid and giant cells in a variety of pulmonary diseases containing granulomas (hypersensitivity pneumonitis, sarcoidosis, Wegener's granulomatosis, berylliosis, tuberculosis) [152], supporting that cathepsin K may be a specific immunohistochemical tool for semi-quantitative evaluation of microgranulomas and granulomatous reactions in interstitial lung diseases. Studies on a mouse model of sarcoidosis found that a lack of cathepsin K increased the incidence of lung granulomas, the size of collagen deposits, and the number of multinucleated giant cells, while a lack of cathepsins L and S activities prevented the formation and/or development of granulomas [153]. The authors suggest that cathepsin inhibitors may be useful for treating lung sarcoidosis.

Cathepsins and Alveolar Proteinosis

Pulmonary alveolar proteinosis is also a rare disease (estimated prevalence of 1/1,000,000; Orphanet: <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>) in which the homeostasis of alveolar surfactant is disturbed. While napsin A and cathepsin H are known to be involved in the intracellular processing of both SP-B and SP-C [39, 66, 68], the activities of both enzymes are increased in the BAL fluids of juvenile and adult patients with proteinosis [154]. In addition to cathepsin H, cathepsins B and L are the most abundant cysteine proteases, and their proforms, which can be activated autocatalytically, are a potential reservoir of mature enzymes [155]. The concentration of

cystatin C in the alveolar space was not increased [154], while kininogens, the major plasma cystatin-like inhibitors of cysteine cathepsins, were extensively degraded [155]. Cathepsin B, unlike cathepsins L and S, is poorly inhibited by kininogens and may hydrolyze them and release cystatin-like fragments, favoring the imbalance that occurs under such physiopathological conditions [98, 156].

Potential Side Effects of Bone Therapeutics

We still need to know more about the characteristics of lung cysteine cathepsins in vivo, and their exact role in homeostasis must be much better understood before they can be identified as pertinent or irrelevant therapeutic targets in pulmonary disorders. Conversely, the use of inhibitors of these enzymes is clearly established and widely validated for conditions ranging from rheumatoid arthritis to osteoporosis and bone metastasis, although there is sometimes a risk of deleterious side effects for the lungs.

Inhibition of Osteoclast Cathepsin K

Mice harboring a genetic deficiency of cathepsin K have been used as a model of the osteopetrotic disease pycnodysostosis (for review: [157]). Unlike osteoporosis, bone density is increased in osteopetrosis due to inadequate osteoclastic bone resorption [158]. Studies of osteopetrotic animal models and correlating human osteopetrotic forms have shown that the disease is not due to demineralization but to defective matrix degradation, linked to a defective gene encoding cathepsin K [159]. But cathepsin K is a valid target for the pharmacological treatment of osteoporosis [8]. The loss of estrogen after menopause is known to favor the development of post-menopausal osteoporosis, and estrogen inhibits cathepsin K synthesis [160]. Just over a dozen of cathepsin K inhibitors are currently available [161], including compounds like MIV-701, Odanacatib, Relicatib, and Balicatib [69, 162, 163]. Among these anti-resorptive drugs, Odanacatib is the most advanced inhibitor of cathepsin K under clinical investigation (Phase 3) [164]. These drugs appear to be more selective by targeting primarily the proteolytic (collagenolytic) activity of cathepsin K from osteoclasts, unlike the widely used bisphosphonates. Nevertheless, clinical trials indicate that some cathepsin K inhibitors may have adverse side effects on the lungs by partly impairing collagen I turnover in lung fibroblasts. Similarly, inhibiting the cathepsin K from synovial fibroblasts in arthritis may also lead to lung and skin fibrosis. But treating patients suffering from chronic pulmonary disorders with glucocorticoids like cortisol and prednisolone also has risks, since they can cause bone loss and fractures.

Glucocorticoid-induced osteoporosis is the main cause of secondary osteoporosis [165].

Targeting Bone Morphogenetic Proteins

BMPs are growth factors that play a key role in the formation of bone and cartilage. But they are also involved in the morphogenesis and alveolarization of lungs (for review: [166]). The production of gremlin, an antagonist of BMP signaling, is increased in idiopathic pulmonary fibrosis [167] and in a model of asbestos-dependent lung fibrosis [168]. Treatment with BMP7 attenuates the fibrotic response [168], but it does not protect bleomycin-injured mice from fibrosis [169]. Analysis of Gremlin-/- mice and local treatment with BMP proteins suggest that the expression of the genes encoding cysteine cathepsin B and aspartyl cathepsin D is regulated by BMP signaling, a pathway responsible for triggering cell death [170].

Tetraspanins and Osteopenia

CD9/CD81 (tetraspanins) double-KO mice spontaneously develop pulmonary emphysema. Their lungs contain increased numbers of alveolar macrophages with an elevated gene expression and proteolytic activity of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-9 and MMP-12), aspartyl cathepsin E, and cysteine cathepsin H. CD9/CD81 double-KO mice have enlarged airspaces and disrupted elastic fibers in the alveoli, and the numbers of osteoclasts also increase with aging in association with kyphosis and osteopenia [171]. The authors suggest that the tetraspanins CD9 and CD81 take part in other events, in addition to regulating proteolytic activities and that their dysfunction may underlie the progression of COPD and the decrease in BMD (bone mineral density). The treatment of osteopenia remains controversial, the main options include bisphosphonates and teriparatide, a recombinant truncated form of parathyroid hormone recently approved by the FDA in 2002 [172]. While teriparatide is a potent stimulator of new bone formation, it can have some noxious side effects, including pneumonia, respiratory collapse, and asthma.

Regulation of Wnt/ β -Catenin Pathway

Accumulation of β -catenin is an essential regulator of proliferation and differentiation of osteoblasts and bone formation. Regulation of Wnt/ β -catenin signaling for the treatment of osteoporosis, rheumatoid arthritis, and osteoarthritis may potentially enhance osteoblastic response [173]. Two anabolic drugs targeting Wnt antagonists Dickkopf-1 and sclerostin are currently under clinical investigation [164]. Dickkopf-1 induces the differentiation factor RANKL, which then stimulates the release of

cathepsin K [174]. Otherwise, the Wnt/ β -catenin pathway is abnormally activated during idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), and its blockade decreases bleomycin-induced pulmonary fibrosis in a murine model, suggesting that targeting Wnt/ β -catenin signaling may be an effective therapeutic approach in the treatment of IPF [175]. Conversely activation of the Wnt/ β -catenin pathway attenuates emphysema [176]. Taken together the essential role of Wnt/ β -catenin signaling in the regulation of bone metabolism and in lung repair mechanisms, side effects of Wnt regulators on lung cathepsin K have to be carefully evaluated.

Prophylactic and Curative Inhibition of Cathepsin S

Cathepsin S inhibitors like peptidyl hydrazones, disulfides, furanones, and nitriles are also of major interest, although none of these compounds has advanced beyond preclinical evaluation [27, 31, 177]. Cathepsin S is an attractive candidate target for drugs in diseases in which immune responses are impaired, such as rheumatoid arthritis, allergy, asthma, diabetes, and lupus erythematosus, because it is involved in MHC II-mediated immune responses. Several lead compounds appear to be effective in disease models of rheumatoid arthritis and allergic asthma and may be also relevant for COPD and psoriasis, providing a proof of principle for further development [178, 179]. Proteomic analysis in allergic eosinophilic lung inflammation provoked by aerosolized ovalbumin identified increased concentrations of cathepsin S in inflamed tissues [146]. Cathepsin S has been associated with asthma although its exact role has not been established [147]. A recent study on a mouse model of asthma demonstrated that cathepsin S KO mice did not develop pulmonary inflammation response to ovalbumin. This is consistent with cathepsin S being involved in the development of the allergic response [149]. The authors suggest that inhibiting cathepsin S in a prophylactic paradigm should reduce airway inflammation. But these pharmacological inhibitors may have side effects of such, including effects on cartilage and bone degradation.

Conclusion

Among the different avenues for new treatments currently being explored for bone diseases, several drugs may indirectly interfere with cysteine cathepsins (e.g., signaling pathways) or are antiproteases that are specifically directed against cathepsins (e.g., Odanacatib). Pharmaceutical industry continues to develop drugs specifically directed against cathepsins K and S. These two enzymes, in addition to being relevant targets in skeletal and arthritic diseases, are also pivotal in the lung physiology. Cathepsin K plays

probably a “beneficial” role in pulmonary homeostasis, whereas the elastinolytic activity of cathepsin S is deleterious under pathophysiological conditions such as BPD and emphysema.

The risks of side effects of bone therapeutics on lung—and more specifically on lung proteases—are very difficult to predict given the status of our current knowledge. The mechanisms of activation, regulation of lung cathepsins, role of the protease/antiprotease balance, as well as identification of their molecular targets (i.e., the cathepsin degradome; [180]) remain poorly understood and characterized. Moreover, little is known about network of proteolytic interactions that occur in lung tissues [181] and about signaling events linking cathepsins and kinases [182]. A better understanding of signaling pathways and molecular mechanisms that modulate the proteolytic activity of cysteine cathepsins is a crucial step to avoid potential therapeutical failures as observed some years ago with inhibitors of metalloproteases [24].

Acknowledgments We thank the French cystic fibrosis association “Vaincre la Mucoviscidose” (VLM, France) (GL, Grant IC0810) and la Région Centre (GL, FibroCat project) for their financial support. We acknowledge the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) for institutional fundings. GL, FL, and JS were supported by Louis Vuitton-Moët Hennessy (LVMH Recherche, Département Sciences du Vivant, Saint Jean de Braye, France). MK holds a doctoral fellowship from MENRT (Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie, France). CN has a PhD grant from VLM, and JS is supported by the “Association Nationale de la Recherche Technique” (ANRT, France; CIFRE doctoral funding). The English text was edited by Dr Owen Parkes (Romagné, France).

References

- Rawlings ND, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 2010;38(Database issue):D227–33.
- Brix K, Dunkhorst A, Mayer K, Jordans S. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie.* 2008;90(2):194–207.
- Wolters PJ, Chapman HA. Importance of lysosomal cysteine proteases in lung disease. *Respir Res.* 2000;1(3):170–7.
- Goulet B, Baruch A, Moon N-S, Poirier M, Sansregret LL, Erickson A, et al. A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor. *Mol Cell.* 2004;14(2):207–19.
- Turk B, Turk D, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers. *Biochim Biophys Acta.* 2000;1477(1–2):98–111.
- Lecaille F, Kaleta J, Brömme D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev.* 2002;102(12):4459–88.
- Wiederanders B. Structure-function relationships in class CA1 cysteine peptidase propeptides. *Acta Biochim Pol.* 2003;50(3):691–713.
- Lecaille F, Brömme D, Lalmanach G. Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie.* 2008;90(2):208–26.
- Bode W, Engh R, Musil D, Laber B, Stubbs M, Huber R, et al. Mechanism of interaction of cysteine proteinases and their protein inhibitors as compared to the serine proteinase-inhibitor interaction. *Biol Chem Hoppe-Seyler.* 1990;371(Suppl):111–8.
- Turk B, Turk D, Salvesen GS. Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Curr Pharm Des.* 2002;8(18):1623–37.
- Abrahamson M, Alvarez-Fernandez M, Nathanson C-M. Cystatins. *Biochem. Soc. Symp.* 2003;(70):179–99.
- Turk V, Stoka V, Turk D. Cystatins: biochemical and structural properties, and medical relevance. *Front Biosci.* 2008;13:5406–20.
- Duncan EM, Muratore-Schroeder TL, Cook RG, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, et al. Cathepsin L proteolytically processes histone H3 during mouse embryonic stem cell differentiation. *Cell.* 2008;135(2):284–94.
- Hook V, Funkelstein L, Lu D, Bark S, Wegrzyn J, Hwang S-R. Proteases for processing proneuropeptides into peptide neurotransmitters and hormones. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2008;48:393–423.
- Roth W, Deussing J, Botchkarev VA, Pauly-Evers M, Saftig P, Hafner A, et al. Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J.* 2000;14(13):2075–86.
- Friedrichs B, Tepel C, Reinheckel T, Deussing J, von Figura K, Herzog V, et al. Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L. *J Clin Invest.* 2003;111(11):1733–45.
- Honey K, Rudensky AY. Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol.* 2003;3(6):472–82.
- Turk B, Turk V. Lysosomes as « suicide bags » in cell death: myth or reality? *J Biol Chem.* 2009;284(33):21783–7.
- Chapman HA, Riese RJ, Shi GP. Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol.* 1997;59:63–88.
- Turk V, Turk B, Turk D. Lysosomal cysteine proteases: facts and opportunities. *EMBO J.* 2001;20(17):4629–33.
- Mohamed MM, Sloane BF. Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6(10):764–75.
- Lafarge J-C, Naour N, Clément K, Guerre-Millo M. Cathepsins and cystatin C in atherosclerosis and obesity. *Biochimie.* 2010;92(11):1580–6.
- Reiser J, Adair B, Reinheckel T. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J Clin Invest.* 2010;120(10):3421–31.
- Turk B. Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(9):785–99.
- Vasiljeva O, Reinheckel T, Peters C, Turk D, Turk V, Turk B. Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets. *Curr Pharm Des.* 2007;13(4):387–403.
- Drag M, Salvesen GS. Emerging principles in protease-based drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2010;9(9):690–701.
- Yasuda Y, Kaleta J, Brömme D. The role of cathepsins in osteoporosis and arthritis: rationale for the design of new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57(7):973–93.
- Yamashita DS, Marquis RW, Xie R, Nidamarthy SD, Oh H-J, Jeong JU, et al. Structure activity relationships of 5-, 6-, and 7-methyl-substituted azepan-3-one cathepsin K inhibitors. *J Med Chem.* 2006;49(5):1597–612.
- Boskey AL, Gelb BD, Pourmand E, Kudrashov V, Doty SB, Spevak L, et al. Ablation of cathepsin k activity in the young mouse causes hypermineralization of long bone and growth plates. *Calcif Tissue Int.* 2009;84(3):229–39.
- Nakagawa TY, Brissette WH, Lira PD, Griffiths RJ, Petrusheva N, Stock J, et al. Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity.* 1999;10(2):207–17.

31. Wiener JJM, Sun S, Thurmond RL. Recent advances in the design of cathepsin S inhibitors. *Curr Top Med Chem*. 2010; 10(7):717–32.
32. Chapman HA, Shi GP. Protease injury in the development of COPD: Thomas A. Neff Lecture Chest. 2000;117(5 Suppl 1):295S–9S.
33. Shapiro SD. Proteinases in chronic obstructive pulmonary disease. *Biochem Soc Trans*. 2002;30(2):98–102.
34. Bühling F, Röcken C, Brasch F, Hartig R, Yasuda Y, Saftig P, et al. Pivotal role of cathepsin K in lung fibrosis. *Am J Pathol*. 2004;164(6):2203–16.
35. Lalmanach G, Diot E, Godat E, Lecaille F, Hervé-Grépinet V. Cysteine cathepsins and caspases in silicosis. *Biol Chem*. 2006;387(7):863–70.
36. Veillard F, Lecaille F, Lalmanach G. Lung cysteine cathepsins: intruders or unorthodox contributors to the kallikrein-kinin system? *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40(6–7):1079–94.
37. Bühling F, Gerber A, Häckel C, Krüger S, Köhnlein T, Brömme D, et al. Expression of cathepsin K in lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;20(4):612–9.
38. Chapman HA, Munger JS, Shi GP. The role of thiol proteases in tissue injury and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994;150(6 Pt 2):S155–9.
39. Bühling F, Waldburg N, Reisenauer A, Heimburg A, Golpon H, Welte T. Lysosomal cysteine proteases in the lung: role in protein processing and immunoregulation. *Eur Respir J*. 2004; 23(4):620–8.
40. Altiock O, Yasumatsu R, Bingol-Karakoc G, Riese RJ, Stahlman MT, Dwyer W, et al. Imbalance between cysteine proteases and inhibitors in a baboon model of bronchopulmonary dysplasia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(3):318–26.
41. Haeckel C, Krueger S, Buehling F, Broemme D, Franke K, Schuetze A, et al. Expression of cathepsin K in the human embryo and fetus. *Dev Dyn*. 1999;216(2):89–95.
42. Davidson JM. Biochemistry and turnover of lung interstitium. *Eur Respir J*. 1990;3(9):1048–63.
43. Punturieri A, Filippov S, Allen E, Caras I, Murray R, Reddy V, et al. Regulation of elastinolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages. *J Exp Med*. 2000;192(6):789–99.
44. Garnerio P, Borel O, Byrjalsen I, Ferreras M, Drake FH, McQueney MS, et al. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J Biol Chem*. 1998; 273(48):32347–52.
45. Kafienah W, Brömme D, Buttle DJ, Croucher LJ, Hollander AP. Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Biochem J*. 1998;331(Pt 3): 727–32.
46. Yasuda Y, Li Z, Greenbaum D, Bogoy M, Weber E, Brömme D. Cathepsin V, a novel and potent elastolytic activity expressed in activated macrophages. *J Biol Chem*. 2004;279(35):36761–70.
47. Novinec M, Grass RN, Stark WJ, Turk V, Baici A, Lenarcic B. Interaction between human cathepsins K, L, and S and elastins: mechanism of elastinolysis and inhibition by macromolecular inhibitors. *J Biol Chem*. 2007;282(11):7893–902.
48. Bryant P, Ploegh H. Class II MHC peptide loading by the professionals. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(1):96–102.
49. Hsing LC, Rudensky AY. The lysosomal cysteine proteases in MHC class II antigen presentation. *Immunol Rev*. 2005;207: 229–41.
50. Zavasnik-Bergant T, Turk B. Cysteine cathepsins in the immune response. *Tissue Antigens*. 2006;67(5):349–55.
51. Bania J, Gatti E, Lelouard H, David A, Cappello F, Weber E, et al. Human cathepsin S, but not cathepsin L, degrades efficiently MHC class II-associated invariant chain in nonprofessional APCs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(11):6664–9.
52. Tolosa E, Li W, Yasuda Y, Wienhold W, Denzin LK, Lautwein A, et al. Cathepsin V is involved in the degradation of invariant chain in human thymus and is overexpressed in myasthenia gravis. *J Clin Invest*. 2003;112(4):517–26.
53. Nakagawa T, Roth W, Wong P, Nelson A, Farr A, Deussing J, et al. Cathepsin L: critical role in Ii degradation and CD4 T cell selection in the thymus. *Science*. 1998;280(5362):450–3.
54. Honey K, Nakagawa T, Peters C, Rudensky A. Cathepsin L regulates CD4 + T cell selection independently of its effect on invariant chain: a role in the generation of positively selecting peptide ligands. *J Exp Med*. 2002;195(10):1349–58.
55. Riese RJ, Mitchell RN, Villadangos JA, Shi GP, Palmer JT, Karp ER, et al. Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *J Clin Invest*. 1998;101(11):2351–63.
56. Shi GP, Bryant RA, Riese R, Verhelst S, Driessen C, Li Z, et al. Role for cathepsin F in invariant chain processing and major histocompatibility complex class II peptide loading by macrophages. *J Exp Med*. 2000;191(7):1177–86.
57. Garcia-Verdugo I, Descamps D, Chignard M, Touqui L, Sallenave J-M. Lung protease/anti-protease network and modulation of mucus production and surfactant activity. *Biochimie*. 2010;92(11):1608–17.
58. Devendra G, Spragg RG. Lung surfactant in subacute pulmonary disease. *Respir Res*. 2002;3:19.
59. Crouch E, Wright JR. Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol*. 2001;63:521–54.
60. Griesse M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art. *Eur Respir J*. 1999;13(6):1455–76.
61. Wright JR. Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(1):58–68.
62. Ito Y, Mason RJ. The effect of interleukin-13 (IL-13) and interferon- γ (IFN- γ) on expression of surfactant proteins in adult human alveolar type II cells in vitro. *Respir Res*. 2010;11:157.
63. Von Bredow C, Wiesener A, Griesse M. Proteolysis of surfactant protein D by cystic fibrosis relevant proteases. *Lung*. 2003; 181(2):79–88.
64. Hirche TO, Crouch EC, Espinola M, Brokelman TJ, Mecham RP, DeSilva N, et al. Neutrophil serine proteinases inactivate surfactant protein D by cleaving within a conserved subregion of the carbohydrate recognition domain. *J Biol Chem*. 2004; 279(26):27688–98.
65. Guttentag S, Robinson L, Zhang P, Brasch F, Bühling F, Beers M. Cysteine protease activity is required for surfactant protein B processing and lamellar body genesis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;28(1):69–79.
66. Brasch F, Ten Brinke A, Johnen G, Ochs M, Kapp N, Müller KM, et al. Involvement of cathepsin H in the processing of the hydrophobic surfactant-associated protein C in type II pneumocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002;26(6):659–70.
67. Brasch F, Ochs M, Kahne T, Guttentag S, Schauer-Vukasinovic V, Derrick M, et al. Involvement of napsin A in the C- and N-terminal processing of surfactant protein B in type-II pneumocytes of the human lung. *J Biol Chem*. 2003;278(49): 49006–14.
68. Ueno T, Linder S, Na C-L, Rice WR, Johansson J, Weaver TE. Processing of pulmonary surfactant protein B by napsin and cathepsin H. *J Biol Chem*. 2004;279(16):16178–84.
69. Palermo C, Joyce JA. Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends Pharmacol Sci*. 2008;29(1): 22–8.
70. López-Otín C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(10):800–8.
71. Ulbricht B, Henny H, Horstmann H, Spring H, Faigle W, Spiess E. Influence of 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid (12(S)-HETE) on the localization of cathepsin B and cathepsin L in human lung tumor cells. *Eur J Cell Biol*. 1997;74(3):294–301.

72. Mai J, Finley RL, Waisman DM, Sloane BF. Human procathepsin B interacts with the annexin II tetramer on the surface of tumor cells. *J Biol Chem*. 2000;275(17):12806–12.
73. Cavallo-Medved D, Mai J, Dosescu J, Sameni M, Sloane BF. Caveolin-1 mediates the expression and localization of cathepsin B, pro-urokinase plasminogen activator and their cell-surface receptors in human colorectal carcinoma cells. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 7):1493–503.
74. Bourguignon LYW, Singleton PA, Diedrich F, Stern R, Gilad E. CD44 interaction with Na⁺ -H⁺ exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem*. 2004;279(26):26991–7007.
75. Giusti I, D'Ascenzo S, Millimaggi D, Taraboletti G, Carta G, Franceschini N, et al. Cathepsin B mediates the pH-dependent proinvasive activity of tumor-shed microvesicles. *Neoplasia*. 2008;10(5):481–8.
76. Gillet L, Roger S, Besson P, Lecaille F, Gore J, Bougnoux P, et al. Voltage-gated sodium channel activity promotes cysteine cathepsin-dependent invasiveness and colony growth of human cancer cells. *J Biol Chem*. 2009;284(13):8680–91.
77. Grimm J, Kirsch DG, Windsor SD, Kim CFB, Santiago PM, Ntziachristos V, et al. Use of gene expression profiling to direct in vivo molecular imaging of lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102(40):14404–9.
78. Gocheva V, Zeng W, Ke D, Klimstra D, Reinheckel T, Peters C, et al. Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev*. 2006;20(5):543–56.
79. Kopitz C, Anton M, Gansbacher B, Krüger A. Reduction of experimental human fibrosarcoma lung metastasis in mice by adenovirus-mediated cystatin C overexpression in the host. *Cancer Res*. 2005;65(19):8608–12.
80. Zhang J, Shridhar R, Dai Q, Song J, Barlow SC, Yin L, et al. Cystatin m: a novel candidate tumor suppressor gene for breast cancer. *Cancer Res*. 2004;64(19):6957–64.
81. Keppler D. Towards novel anti-cancer strategies based on cystatin function. *Cancer Lett*. 2006;235(2):159–76.
82. Li W, Ding F, Zhang L, Liu Z, Wu Y, Luo A, et al. Overexpression of stefin A in human esophageal squamous cell carcinoma cells inhibits tumor cell growth, angiogenesis, invasion, and metastasis. *Clin Cancer Res*. 2005;11(24 Pt 1):8753–62.
83. Burden RE, Gormley JA, Jaquin TJ, Small DM, Quinn DJ, Hegarty SM, et al. Antibody-mediated inhibition of cathepsin S blocks colorectal tumor invasion and angiogenesis. *Clin Cancer Res*. 2009;15(19):6042–51.
84. Ward C, Kuehn D, Burden RE, Gormley JA, Jaquin TJ, Gazdoui M, et al. Antibody targeting of cathepsin S inhibits angiogenesis and synergistically enhances anti-VEGF. *PLoS ONE*. 2010;5(9).
85. Jean D, Bar-Eli M, Huang S, Xie K, Rodrigues-Lima F, Hermann J, et al. A cysteine proteinase, which cleaves human C3, the third component of complement, is involved in tumorigenicity and metastasis of human melanoma. *Cancer Res*. 1996;56(2):254–8.
86. Reinheckel T, Hagemann S, Dollwet-Mack S, Martinez E, Lohmüller T, Zlatkovic G, et al. The lysosomal cysteine protease cathepsin L regulates keratinocyte proliferation by control of growth factor recycling. *J Cell Sci*. 2005;118(Pt 15):3387–95.
87. Dennemärker J, Lohmüller T, Mayerle J, Tacke M, Lerch MM, Coussens LM, et al. Deficiency for the cysteine protease cathepsin L promotes tumor progression in mouse epidermis. *Oncogene*. 2010;29(11):1611–21.
88. Duffy MJ. Proteases as prognostic markers in cancer. *Clin Cancer Res*. 1996;2(4):613–8.
89. Kos J, Werle B, Lah T, Brunner N. Cysteine proteinases and their inhibitors in extracellular fluids: markers for diagnosis and prognosis in cancer. *Int J Biol Markers*. 2000;15(1):84–9.
90. Herszényi L, Farinati F, Cardin R, István G, Molnár LD, Hritz I, et al. Tumor marker utility and prognostic relevance of cathepsin B, cathepsin L, urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor type-1, CEA and CA 19–9 in colorectal cancer. *BMC Cancer*. 2008;8:194.
91. Kos J, Lah TT. Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review). *Oncol Rep*. 1998;5(6):1349–61.
92. Lah TT, Kokalj-Kunovar M, Drobnic-Kosorok M, Babnik J, Golouh R, Vrhovec I, et al. Cystatins and cathepsins in breast carcinoma. *Biol Chem Hoppe-Seyler*. 1992;373(7):595–604.
93. Werle B, Schanzenbächer U, Lah TT, Ebert E, Jülke B, Ebert W, et al. Cystatins in non-small cell lung cancer: tissue levels, localization and relation to prognosis. *Oncol Rep*. 2006;16(4):647–55.
94. Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol Rev*. 1992;44(1):1–80.
95. Desmazes C, Galineau L, Gauthier F, Brömme D, Lalmanach G. Kininogen-derived peptides for investigating the putative vasoactive properties of human cathepsins K and L. *Eur J Biochem*. 2003;270(1):171–8.
96. Naudin C, Lecaille F, Chowdhury S, Krupa JC, Purisima E, Mort JS, et al. The occluding loop of cathepsin B prevents its effective inhibition by human kininogens. *J Mol Biol*. 2010;400(5):1022–35.
97. Desmazes C, Gauthier F, Lalmanach G. Cathepsin L, but not cathepsin B, is a potential kininogenase. *Biol Chem*. 2001;382(5):811–5.
98. Puzer L, Vercesi J, Alves MFM, Barros NMT, Araujo MS, Aparecida Juliano M, et al. A possible alternative mechanism of kinin generation in vivo by cathepsin L. *Biol Chem*. 2005;386(7):699–704.
99. Godat E, Lecaille F, Desmazes C, Duchêne S, Weidauer E, Saftig P, et al. Cathepsin K: a cysteine protease with unique kinin-degrading properties. *Biochem J*. 2004;383(Pt. 3):501–6.
100. Lecaille F, Vandier C, Godat E, Hervé-Grépinet V, Brömme D, Lalmanach G. Modulation of hypotensive effects of kinins by cathepsin K. *Arch Biochem Biophys*. 2007;459(1):129–36.
101. Heitsch H. Bradykinin B2 receptor as a potential therapeutic target. *Drug News Perspect*. 2000;13(4):213–25.
102. Ohashi K, Naruto M, Nakaki T, Sano E. Identification of interleukin-8 converting enzyme as cathepsin L. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1649(1):30–9.
103. Wille A, Heimburg A, Gerber A, Reisenauer A, Welte T, Bühling F. Functional consequences of cathepsin L deficiency in human lung epithelial cells. *Biol Chem*. 2002;383(7–8):1291–6.
104. Bühling F, Reisenauer A, Gerber A, Krüger S, Weber E, Brömme D, et al. Cathepsin K—a marker of macrophage differentiation? *J Pathol*. 2001;195(3):375–82.
105. Oudijk EJD, Lammers JWJ, Koenderman L. Systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl*. 2003;46:5s–13s.
106. Owen CA. Proteinases and oxidants as targets in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(4):373–85 (discussion 394–95).
107. Barnes PJ, Shapiro SD, Pauwels RA. Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J*. 2003;22(4):672–88.
108. Takeyabu K, Betsuyaku T, Nishimura M, Yoshioka A, Tanino M, Miyamoto K, et al. Cysteine proteinases and cystatin C in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Eur Respir J*. 1998;12(5):1033–9.
109. Golovatch P, Mercer BA, Lemaître V, Wallace A, Foronjy RF, D'Armiento J. Role for cathepsin K in emphysema in smoke-exposed guinea pigs. *Exp Lung Res*. 2009;35(8):631–45.

110. Kang M-J, Homer RJ, Gallo A, Lee CG, Crothers KA, Cho SJ, et al. IL-18 is induced and IL-18 receptor alpha plays a critical role in the pathogenesis of cigarette smoke-induced pulmonary emphysema and inflammation. *J Immunol.* 2007;178(3):1948–59.
111. Puddu P, Fantuzzi L, Borghi P, Varano B, Rainaldi G, Guillemard E, et al. IL-12 induces IFN-gamma expression and secretion in mouse peritoneal macrophages. *J Immunol.* 1997;159(7):3490–7.
112. Zheng T, Zhu Z, Wang Z, Homer RJ, Ma B, Riese RJ, et al. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest.* 2000;106(9):1081–93.
113. Zheng T, Kang MJ, Crothers K, Zhu Z, Liu W, Lee CG, et al. Role of cathepsin S-dependent epithelial cell apoptosis in IFN-gamma-induced alveolar remodeling and pulmonary emphysema. *J Immunol.* 2005;174(12):8106–15.
114. Williams AS, Eynott PR, Leung S-Y, Nath P, Jupp R, De Sanctis GT, et al. Role of cathepsin S in ozone-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *Pulm Pharmacol Ther.* 2009;22(1):27–32.
115. Jin FY, Nathan C, Radzioch D, Ding A. Secretory leukocyte protease inhibitor: a macrophage product induced by and antagonistic to bacterial lipopolysaccharide. *Cell.* 1997;88(3):417–26.
116. Geraghty P, Greene CM, O'Mahony M, O'Neill SJ, Taggart CC, McElvaney NG. Secretory leukocyte protease inhibitor inhibits interferon-gamma-induced cathepsin S expression. *J Biol Chem.* 2007;282(46):33389–95.
117. Taggart CC, Lowe GJ, Greene CM, Mulgrew AT, O'Neill SJ, Levine RL, et al. Cathepsin B, L, and S cleave and inactivate secretory leukoprotease inhibitor. *J Biol Chem.* 2001;276(36):33345–52.
118. Zhang X, Shan P, Jiang G, Cohn L, Lee PJ. Toll-like receptor 4 deficiency causes pulmonary emphysema. *J Clin Invest.* 2006;116(11):3050–9.
119. Hanothiaux MH, Scharfman A, Wastiaux A, Cornu L, van Brussel E, Lafitte JJ, et al. An attempt to evaluate lung aggression in monkey silicosis: hydrolases, peroxidase and antiproteases activities in serial bronchoalveolar lavages. *Eur Respir J.* 1991;4(2):191–204.
120. Langley RJ, Kalra R, Mishra NC, Hahn FF, Razani-Boroujerdi S, Singh SP, et al. A biphasic response to silica: I Immunostimulation is restricted to the early stage of silicosis in lewis rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;30(6):823–9.
121. Brain JD. Toxicological aspects of alterations of pulmonary macrophage function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1986;26:547–65.
122. Pérez-Ramos J, de Lourdes Segura-Valdez M, Vanda B, Selman M, Pardo A. Matrix metalloproteinases 2, 9, and 13, and tissue inhibitors of metalloproteinases 1 and 2 in experimental lung silicosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999;160(4):1274–82.
123. Scabilloni JF, Wang L, Antonini JM, Roberts JR, Castranova V, Mercer RR. Matrix metalloproteinase induction in fibrosis and fibrotic nodule formation due to silica inhalation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;288(4):L709–17.
124. Van den Brûle S, Misson P, Bühling F, Lison D, Huaux F. Overexpression of cathepsin K during silica-induced lung fibrosis and control by TGF-beta. *Respir Res.* 2005;6:84.
125. Perdereau C, Godat E, Maurel M-C, Hazouard E, Diot E, Lalmanach G. Cysteine cathepsins in human silicotic bronchoalveolar lavage fluids. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1762(3):351–6.
126. Quinn DJ, Weldon S, Taggart CC. Antiproteases as therapeutics to target inflammation in cystic fibrosis. *Open Respir Med J.* 2010;4:20–31.
127. Martin SL, Moffitt KL, McDowell A, Greenan C, Bright-Thomas RJ, Jones AM, et al. Association of airway cathepsin B and S with inflammation in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2010;45(9):860–8.
128. Tate S, MacGregor G, Davis M, Innes JA, Greening AP. Airways in cystic fibrosis are acidified: detection by exhaled breath condensate. *Thorax.* 2002;57(11):926–9.
129. Taggart CC, Greene CM, Smith SG, Levine RL, McCray PB, O'Neill S, et al. Inactivation of human beta-defensins 2 and 3 by elastolytic cathepsins. *J Immunol.* 2003;171(2):931–7.
130. Rogan MP, Taggart CC, Greene CM, Murphy PG, O'Neill SJ, McElvaney NG. Loss of microbicidal activity and increased formation of biofilm due to decreased lactoferrin activity in patients with cystic fibrosis. *J Infect Dis.* 2004;190(7):1245–53.
131. Taggart CC, Cryan S-A, Weldon S, Gibbons A, Greene CM, Kelly E, et al. Secretory leukoprotease inhibitor binds to NF-kappaB binding sites in monocytes and inhibits p65 binding. *J Exp Med.* 2005;202(12):1659–68.
132. Johnson DA, Barrett AJ, Mason RW. Cathepsin L inactivates alpha 1-proteinase inhibitor by cleavage in the reactive site region. *J Biol Chem.* 1986;261(31):14748–51.
133. Gibbons AM, McElvaney NG, Taggart CC, Cryan S-A. Delivery of rSLPI in a liposomal carrier for inhalation provides protection against cathepsin L degradation. *J Microencapsul.* 2009;26(6):513–22.
134. Wright CD, Havill AM, Middleton SC, Kashem MA, Lee PA, Dripps DJ, et al. Secretory leukocyte protease inhibitor prevents allergen-induced pulmonary responses in animal models of asthma. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;289(2):1007–14.
135. Forteza RM, Ahmed A, Lee T, Abraham WM. Secretory leukocyte protease inhibitor, but not alpha-1 protease inhibitor, blocks tryptase-induced bronchoconstriction. *Pulm Pharmacol Ther.* 2001;14(2):107–10.
136. McElvaney NG, Nakamura H, Birrer P, Hébert CA, Wong WL, Alphonso M, et al. 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.* 1992;90(4):1296–301.
137. Gibbons A, McElvaney NG, Cryan S-A. A dry powder formulation of liposome-encapsulated recombinant secretory leukocyte protease inhibitor (rSLPI) for inhalation: preparation and characterisation. *AAPS PharmSciTech.* 2010;11(3):1411–21.
138. Geraghty P, Rogan MP, Greene CM, Brantly ML, O'Neill SJ, Taggart CC, et al. Alpha-1-antitrypsin aerosolised augmentation abrogates neutrophil elastase-induced expression of cathepsin B and matrix metalloproteinase 2 in vivo and in vitro. *Thorax.* 2008;63(7):621–6.
139. Coalson JJ. Pathology of new bronchopulmonary dysplasia. *Semin Neonatol.* 2003;8(1):73–81.
140. Merritt TA, Cochrane CG, Holcomb K, Bohl B, Hallman M, Strayer D, et al. Elastase and alpha 1-proteinase inhibitor activity in tracheal aspirates during respiratory distress syndrome. Role of inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *J Clin Invest.* 1983;72(2):656–66.
141. Bruce MC, Schuyler M, Martin RJ, Starcher BC, Tomashefski JF, Wedig KE. Risk factors for the degradation of lung elastic fibers in the ventilated neonate. Implications for impaired lung development in bronchopulmonary dysplasia. *Am Rev Respir Dis.* 1992;146(1):204–12.
142. Knaapi J, Lukkarinen H, Kiviranta R, Steiner A, Lassus P, Andersson S, et al. Cathepsin K expression is diminished in infants with bronchopulmonary dysplasia. *Acta Paediatr.* 2006;95(10):1298–300.
143. Hirakawa H, Pierce RA, Bingol-Karakoc G, Karaaslan C, Weng M, Shi G-P, et al. Cathepsin S deficiency confers protection

- from neonatal hyperoxia-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176(8):778–85.
144. Srivastava M, Jung S, Wilhelm J, Fink L, Bühling F, Welte T, et al. The inflammatory versus constitutive trafficking of mononuclear phagocytes into the alveolar space of mice is associated with drastic changes in their gene expression profiles. *J Immunol*. 2005;175(3):1884–93.
 145. Layton GT, Harris SJ, Bland FA, Lee SR, Fearn S, Kaleta J, et al. Therapeutic effects of cysteine protease inhibition in allergic lung inflammation: inhibition of allergen-specific T lymphocyte migration. *Inflamm Res*. 2001;50(8):400–8.
 146. Fajardo I, Svensson L, Bucht A, Pejler G. Increased levels of hypoxia-sensitive proteins in allergic airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(5):477–84.
 147. Cimerman N, Brguljan PM, Krasovec M, Suskovic S, Kos J. Circadian and concentration profile of cathepsin S in sera from healthy subjects and asthmatic patients. *Pflugers Arch*. 2001;442(61):R204–6.
 148. Korideck H, Peterson JD. Noninvasive quantitative tomography of the therapeutic response to dexamethasone in ovalbumin-induced murine asthma. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;329(3):882–9.
 149. Deschamps K, Cromlish W, Weicker S, Lamontagne S, Huszar SL, Gauthier JY, et al. Genetic and pharmacological evaluation of cathepsin S in a mouse model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol*. (DOI information: doi: [10.1165/rcmb.2009-0392OC](https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0392OC)) (in press).
 150. Somoza JR, Palmer JT, Ho JD. The crystal structure of human cathepsin F and its implications for the development of novel immunomodulators. *J Mol Biol*. 2002;322(3):559–68.
 151. Chilosi M, Pea M, Martignoni G, Brunelli M, Gobbo S, Poletti V, et al. Cathepsin-k expression in pulmonary lymphangioleiomyomatosis. *Mod Pathol*. 2009;22(2):161–6.
 152. Reghellin D, Poletti V, Tomassetti S, Dubini A, Cavazza A, Rossi G, et al. Cathepsin-K is a sensitive immunohistochemical marker for detection of micro-granulomas in hypersensitivity pneumonitis. *Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis*. 2010;27(1):57–63.
 153. Samokhin AO, Gauthier JY, Percival MD, Brömme D. Lack of cathepsin activities alter or prevent the development of lung granulomas in a mouse model of sarcoidosis. *Respir Res*. 2011;12:13.
 154. Woischnik M, Bauer A, Aboutaam R, Pamir A, Stanzel F, de Blic J, et al. Cathepsin H and napsin A are active in the alveoli and increased in alveolar proteinosis. *Eur Respir J*. 2008;31(6):1197–204.
 155. Serveau-Avesque C, Martino MF-D, Hervé-Grépinet V, Hazouard E, Gauthier F, Diot E, et al. Active cathepsins B, H, K, L and S in human inflammatory bronchoalveolar lavage fluids. *Biol Cell*. 2006;98(1):15–22.
 156. Lalmanach G, Naudin C, Lecaillon F, Fritz H. Kininogens: more than cysteine protease inhibitors and kinin precursors. *Biochimie*. 2010;92(11):1568–79.
 157. Lazner F, Gowen M, Pavasovic D, Kola I. Osteopetrosis and osteoporosis: two sides of the same coin. *Hum Mol Genet*. 1999;8(10):1839–46.
 158. Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, et al. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(23):13453–8.
 159. Gowen M, Lazner F, Dodds R, Kapadia R, Feild J, Tavaría M, et al. Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization. *J Bone Miner Res*. 1999;14(10):1654–63.
 160. Mano H, Yuasa T, Kameda T, Miyazawa K, Nakamaru Y, Shiokawa M, et al. Mammalian mature osteoclasts as estrogen target cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;223(3):637–42.
 161. Desmarais S, Massé F, Percival MD. Pharmacological inhibitors to identify roles of cathepsin K in cell-based studies: a comparison of available tools. *Biol Chem*. 2009;390(9):941–8.
 162. Deaton DN, Hassell AM, McFadyen RB, Miller AB, Miller LR, Shewchuk LM, et al. Novel and potent cyclic cyanamide-based cathepsin K inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2005;15(7):1815–9.
 163. Brömme D, Lecaillon F. Cathepsin K inhibitors for osteoporosis and potential off-target effects. *Expert Opin Investig Drugs*. 2009;18(5):585–600.
 164. Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future. *Lancet*. 2011;377:1276–87.
 165. Bouvard B, Legrand E, Audran M, Chappard D. Glucocorticoid-induced osteoporosis: a review. *Clinic Rev Bone Miner Metab*. 2009;8(1):15–26.
 166. Chapman HA. Epithelial-mesenchymal interactions in pulmonary fibrosis. *Annu Rev Physiol*. 2011;73:413–35.
 167. Koli K, Myllärniemi M, Vuorinen K, Salmenkivi K, Ryyänen MJ, Kinnula VL, et al. Bone morphogenetic protein-4 inhibitor gremlin is overexpressed in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*. 2006;169(1):61–71.
 168. Myllärniemi M, Lindholm P, Ryyänen MJ, Kliment CR, Salmenkivi K, Keski-Oja J, et al. Gremlin-mediated decrease in bone morphogenetic protein signaling promotes pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(3):321–9.
 169. Murray LA, Hackett TL, Warner SM, Shaheen F, Argentieri RL, Dudas P, et al. BMP-7 does not protect against bleomycin-induced lung or skin fibrosis. *PLoS ONE*. 2008;3(12):e4039.
 170. Zuzarte-Luis V, Montero JA, Kawakami Y, Izpisua-Belmonte JC, Hurler JM. Lysosomal cathepsins in embryonic programmed cell death. *Dev Biol*. 2007;301(1):205–17.
 171. Takeda Y, He P, Tachibana I, Zhou B, Miyado K, Kaneko H, et al. Double deficiency of tetraspanins CD9 and CD81 alters cell motility and protease production of macrophages and causes chronic obstructive pulmonary disease-like phenotype in mice. *J Biol Chem*. 2008;283(38):26089–97.
 172. Saag KG, Shane E, Boonen S, Marín F, Donley DW, Taylor KA, et al. Teriparatide or alendronate in glucocorticoid-induced osteoporosis. *N Engl J Med*. 2007;357(20):2028–39.
 173. Johnson ML, Kamel MA. The Wnt signaling pathway and bone metabolism. *Curr Opin Rheumatol*. 2007;19(4):376–82.
 174. Aicher A, Kollet O, Heeschen C, Liebner S, Urbich C, Ihling C, et al. The Wnt antagonist Dickkopf-1 mobilizes vasculogenic progenitor cells via activation of the bone marrow endosteal stem cell niche. *Circ Res*. 2008;103(8):796–803.
 175. Kim TH, Kim S-H, Seo J-Y, Chung H, Kwak HJ, Lee S-K, et al. Blockade of the Wnt/ β -catenin pathway attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Tohoku J Exp Med*. 2011;223(1):45–54.
 176. Kneidinger N, Yildirim AO, Callegari J, Takenaka S, Stein MM, Dumitrescu R, et al. Activation of the WNT/ β -catenin pathway attenuates experimental emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;183(6):723–33.
 177. Leroy V, Thurairatnam S. Cathepsin S inhibitors. *Expert Opin Ther Pat*. 2004;14(3):301–11.
 178. Link JO, Zipfel S. Advances in cathepsin S inhibitor design. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2006;9(4):471–82.
 179. Gupta S, Singh RK, Dastidar S, Ray A. Cysteine cathepsin S as an immunomodulatory target: present and future trends. *Expert Opin Ther Targets*. 2008;12(3):291–9.
 180. López-Otín C, Overall CM. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(7):509–19.
 181. Mason SD, Joyce JA. Proteolytic networks in cancer. *Trends Cell Biol*. 2011;21(4):228–37.
 182. López-Otín C, Hunter T. The regulatory crosstalk between kinases and proteases in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(4):278–92.

Régulation de l'activité de la protéine du surfactant SP-A par les cathepsines à cystéine pulmonaires : Conséquences sur les propriétés antibactériennes de SP-A

Résumé

Les cathepsines à cystéine (CP) participent à la dégradation du tissu bronchique ainsi qu'à l'inactivation de protéines de l'immunité innée lors de maladies inflammatoires. Lors de la mucoviscidose (CF), on observe un déficit de la protéine du surfactant pulmonaire SP-A, qui participe à la défense antimicrobienne. Nous avons caractérisé les CP dans des expectorations CF et analysé leur capacité à hydrolyser le SP-A. La balance CP/inhibiteurs est déséquilibrée en faveur des CP et la cathepsine B participe à ce déséquilibre en hydrolysant leurs inhibiteurs, les kininogènes. Cependant, les CP ne sont pas des marqueurs de colonisation par *Pseudomonas aeruginosa*. De plus, la cathepsine S clive sélectivement SP-A dans son site de liaison aux sucres et aux lipides, induisant la perte de ses propriétés antibactériennes et d'agrégation, contribuant au déficit de la défense innée, à la perte d'homéostasie du surfactant et à l'exacerbation de l'inflammation au cours de la mucoviscidose.

Mots-clefs : Cathepsines à cystéine, mucoviscidose, kininogènes, protéines du surfactant, SP-A

Résumé en anglais

Cysteine cathepsins (CP) that are implicated in bronchial tissue injuries and inactivation of antibacterial proteins emerge as key players in pulmonary inflammations. A decrease of pulmonary surfactant protein SP-A which is involved in innate host defence has been reported in patients suffering from cystic fibrosis (CF). We characterized sputum CP and their ability to hydrolyze SP-A. There is an imbalance CP/inhibitor tipped in favor of CP proteolytic activities. Furthermore, cathepsin B, which is able to degrade major plasma CP inhibitor, kininogens, favors this imbalance. However, CP are not biomarkers of colonization by *Pseudomonas aeruginosa*. Moreover, Cat S cleaves SP-A specifically in its lectin-like domain (CRD) that conducts to the loss of antibacterial and aggregation properties. So, CP, especially cathepsin S, participate to the deficiency of innate immunity, surfactant homeostasis defect and to the exacerbation of inflammatory response in cystic fibrosis.

Keywords: Cysteine cathepsins, cystic fibrosis, kininogens, surfactant proteins, SP-A