



UNIVERSITÉ FRANÇOIS RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

INSERM UMR 1100 : « Pathologies respiratoires : protéolyse et aérosolthérapie »
Centre d'Étude des Pathologies Respiratoires
LVMH Recherche - Département Sciences du Vivant

THÈSE présentée par :

Juliette SAGE

soutenue le : 04 décembre 2012

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

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

Rôle de la cathepsine S dans le remodelage de la membrane basale et régulation de son activité par des glycosaminoglycanes

THÈSE dirigée par :

Mr LECAILLE Fabien

Maître de Conférences HDR, Université François Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :

Mr FRIGUET Bertrand

Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris

Mme LE CABEC Véronique

Chargée de Recherche HDR, CNRS, Toulouse

JURY :

Mme AUMAILLEY Monique

Professeur, Université de Cologne, Allemagne

Mr FRIGUET Bertrand

Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris

Mr LALMANACH Gilles

Professeur, Université François Rabelais, Tours

Mme LE CABEC Véronique

Chargée de Recherche HDR, CNRS, Toulouse

Mr LECAILLE Fabien

Maître de Conférences HDR, Université François Rabelais, Tours

Mr LORETTE Gérard

Professeur, Université François Rabelais, Tours

Mme NIZARD Carine

Coordinatrice scientifique, LVMH Recherche, St Jean de Braye

*Pour le savant, croire la science achevée est toujours une illusion
aussi complète que le serait pour l'historien de croire l'histoire terminée.*

Louis-Victor de Broglie

Remerciements

Ce travail a été effectué à l'INSERM UMR 1100 « Pathologies respiratoires : protéolyse et aérosolthérapie » - Centre d'Étude des Pathologies Respiratoires, Tours, en collaboration avec le département Sciences du Vivant de LVMH Recherche Parfums et Cosmétiques, Saint Jean de Braye. Cette étude a bénéficié du soutien financier de l'Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT). Je tiens à les remercier d'avoir permis la réalisation de mes travaux dans d'excellentes conditions.

Je souhaite exprimer vivement mes remerciements à :

Monsieur **Francis Gauthier**, Professeur à l'Université François Rabelais (Tours) et Directeur de Recherche de l'INSERM U618 « Protéases et Vectorisation Pulmonaires », ainsi que Monsieur **Mustapha Si-Tahar**, Directeur de Recherche de l'INSERM UMR 1100 « Pathologies respiratoires : protéolyse et aérosolthérapie », de m'avoir accueillie au sein de leur unité.

Monsieur **Gilles Lalmanach**, Professeur à l'Université François Rabelais, pour avoir été l'instigateur de ce beau projet qui me correspond à 100 %, pour la confiance que tu m'as accordée et tes nombreux conseils avisés. Ce fut un plaisir de travailler dans ton groupe.

Monsieur **Fabien Lecaille**, Maître de Conférences à l'Université François Rabelais, pour avoir assuré la direction scientifique de cette thèse. Merci de ta confiance, de ton enthousiasme et de ta disponibilité de chaque instant, et ce, depuis mon premier stage en licence.

Madame **Véronique Le Cabec**, Chargée de Recherche CR1 CNRS à l'Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale, Université Paul Sabatier (Toulouse III), et Monsieur **Bertrand Friguet**, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI), pour me faire l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail.

Madame **Monique Aumailley**, Professeur à l'Université de Cologne (Allemagne), et Monsieur **Gérard Lorette**, Professeur à l'Université François Rabelais et Praticien Hospitalier en Dermato-vénéréologie au CHRU Trousseau, pour avoir accepté d'être les examinateurs de cette thèse.

Madame **Carine Nizard**, Coordinatrice scientifique de LVMH Recherche (Centre de recherche des Cordeliers, Paris), pour m'avoir impliquée dans la culture de l'entreprise LVMH, notamment en me permettant de présenter les jalons de ce projet, ainsi que pour tes conseils scientifiques et tes encouragements.

Monsieur **Eric Perrier**, Directeur R&D de LVMH Recherche (St Jean de Braye), pour son intérêt pour ce projet et ses remarques constructives lors de mes jalons.

Madame **Sylvianne Schnebert**, Responsable du Département Sciences du Vivant de LVMH Recherche, pour m'avoir intégrée à son département, et permis d'assister et de présenter mes résultats lors de parfois lointains congrès (Charleston, en Caroline du Sud, restera un souvenir impérissable). Merci également de m'avoir permis de participer à la majestueuse journée des Catherinettes Dior...

La thèse n'était pas prévue au départ, je l'ai trouvée sur mon chemin... Pour mon plus grand bien, puisqu'elle m'a permis de m'affirmer, de prendre confiance en moi, de m'épanouir. Alors merci la vie (ou le destin) ; et surtout merci à tous ceux qui, pendant ces quatre années passées à leurs côtés, m'ont fait évoluer ! Faire une thèse CIFRE (Conventions Industrielles de Formation par la REcherche), m'a permis d'appréhender deux mondes différents mais complémentaires que sont la recherche académique et la recherche privée, mais aussi de faire partie intégrante de deux laboratoires et d'y rencontrer deux fois plus de personnes, que je tiens à remercier sincèrement :

LVMH Recherche – Département Sciences du Vivant (Saint Jean de Braye) :

Robin Kurfurst, Coordinateur des Plateformes Technologiques, pour son implication dans ce projet et ses conseils avisés.

Emmanuelle Leblanc-Noblesse, Responsable de la plateforme Imagerie, **Milène Juan** et **Philippe Schaeffer**, pour m'avoir aidée et conseillée sur la partie immunohistochimie. Emmanuelle, merci de ta confiance pour m'avoir laissée utiliser sans problème le microscope confocal. Philippe, merci d'avoir toujours répondu présent lorsque j'ai eu besoin de conseils et de tes services pour faire parvenir du matériel (quel trafic !).

Marc Dumas, Responsable de la plateforme Modélisation Cellulaire et Tissulaire, **Clarisse Marteau** et **Rachid Boulgana**, pour avoir fourni les cellules et les épidermes, parfois en urgence ! Merci de votre aide également pour tous les renseignements que j'ai dû vous demander pour l'écriture de mon premier papier...

Kristell Lazou, **Valentin Jeronimo-Monteiro**, **Lauren Savary**, **Jocelyne Franchi**, **Françoise Pellicier**, **Jean-Hubert Cauchard**, **Marielle Moreau**, **Isabelle Renimel**, **Jamila Bouchtane**, pour leur accueil dans leur laboratoire, et **Marion Martin** pour sa gentillesse et m'avoir fait découvrir les tests panélistes.

Sabrina Radjei, également doctorante CIFRE de LVMH, que je n'ai rencontrée que peu mais que j'ai beaucoup appréciée ! Merci de ces échanges sur nos vies de doctorantes CIFRE.

Catherine Danonville, de m'avoir réservé l'hôtel pour mes déplacements à St Jean de Braye et de t'être enquis de savoir si je m'y sentais bien.

INSERM UMR 1100 / EA 6503 (Tours) :

Les « déjà-docteurs » : **Annabelle Tanga**, pour tes discussions toujours intéressantes et ta sympathie ; **Florian Veillard** et **Clément Naudin** pour avoir répondu à mes questions parfois naïves, pour m'avoir aidée et conseillée grâce à votre plus grande expérience, plus particulièrement en ce qui concerne la bonne utilisation du Kontron et l'enzymologie en général ☺. Clément, merci aussi pour ton amitié durant ces trois ans.

Mes « co-thésardes » : **Marion Lavergne** et **Alice Dubois**, issues de la même promo que moi depuis la licence... Le temps passe si vite ! Merci pour vos encouragements durant la thèse et la rédaction du mémoire, je pense fort à vous qui entamez en ce moment le vôtre !

Les « futurs docteurs » : **Laurent Guillemineault**, **Thomas Kryza**, **Noémie Michel**, **David Ginguene** et plus particulièrement **Clémence Henry**, dont j'apprécie le caractère pétillant, **Pierre-Marie Andrault**, qui « n'est pas mon stagiaire ! ». PM, je suis tranquille je sais que la relève est bien assurée au laboratoire avec toi ! Enfin, **Mariana Kasabova**, mon amie bulgare, qui a ajouté un peu d'exotisme à notre laboratoire tourangeau. Merci pour ta bonne humeur qui ne failli (presque) jamais.

Mes voisines de bureau : **Amandine Vallet**, **Flora Paul**, **Lise Vanderlynden**, **Delphine Fouquenet**, **Christelle Parent**, **Déborah Bréa**. Mais aussi **Clarisse Dubray**, collègue très sympathique, tu fais que chaque jour se suit, mais ne se ressemble pas ! **Alix Joulin-Giet**, pour sa joie de vivre et son entrain. Merci d'égayer notre quotidien !

Je n'oublie pas ceux qui ne sont plus au laboratoire mais dont j'ai eu la chance de croiser la route : **Gwenhaél Jégot**, ma « BFF », aussi addict des séries américaines que moi... Merci pour ces longues discussions sur Booth et Brennan (Bones). *I believe you can fly...* **Hélène Serrano**, alias Blondinette, pour sa chaleur du Sud et sa sympathie. **Emilie Chapelin**, merci pour ta gentillesse et ton amitié.

Ahlame Saïdi, pour sa sympathie ainsi que pour ses conseils et son aide pour la culture cellulaire et la technique de qPCR.

Sandrine Dallet-Choisy et **Marie-Louise Zani**, pour leurs conseils et leur humour.

Estelle Nocchi et **Nathalie Riche**, super-secrétaires le jour. Merci de votre grande efficacité et surtout de votre compréhension lors de commandes urgentes...

Martine Berton, « Madame Propre », pour sa générosité et sa gentillesse. Merci pour toutes tes mousses au chocolat, et autres desserts, ma préférence allant à tes rousserolles que tu m'as fait découvrir !

Stéphane Beauclercq, stagiaire de licence que j'ai eu le plaisir d'encadrer durant ses deux stages au laboratoire, et qui peut maintenant lui aussi faire des western-blot plus vite que son ombre... Merci de ton aide sur l'hydrolyse du nidogène-2 par les cathepsines.

Nathalie Heuzé-Vourch' et **Sophie Hamard** de votre aide pour la salle de culture.

Merci également aux autres membres du laboratoire que je n'ai pas cité.

Je voudrais également remercier les personnes qui m'ont apporté leur aide et leur expertise sur différents aspects de ma thèse :

Bilel Jelassi et **Sébastien Roger** (INSERM U1069 « Nutrition, Croissance et Cancer », Tours) pour m'avoir initiée aux études d'invasion cellulaire en chambre de Boyden.

Sylvie Canépa et **Marie-Christine Maurel** (Laboratoire d'Analyses des Interactions Moléculaires, INRA de Nouzilly), pour leur aide sur l'effet des cathepsines sur les interactions entre les constituants de la membrane basale par BIAcore.

Alex Poulin (LVMH Recherche) pour les études de rhéologie de l'ECM gel.

Florian Mallèvre, **André Roget** et **Thierry Livache** (Structure et Propriétés d'Architectures Moléculaires, CEA de Grenoble), pour mes deux semaines très agréables dans leur laboratoire où nous avons travaillé sur les interactions glycosaminoglycanes/cathepsines.

Sergey A. Samsonov, **Jan-Philip Gehrcke** et **M. Teresa Pisabarro** (Université de Dresden, Allemagne) pour la modélisation moléculaire du complexe entre la cathepsine S et le C4-S.

Delphine de Quéral (LVMH Recherche) pour avoir réalisé l'analyse statistique de l'influence de l'âge sur l'expression des cathepsines.

Pour finir je remercie du fond du cœur mes proches :

Papa, même si tu ne dois pas bien comprendre pourquoi je suis encore dans les études à 26 ans, merci d'avoir toujours demandé si ça se passait bien, surtout ces derniers temps par rapport à l'avancée de mon mémoire !

Maman, un jour tu m'as dédiée une chanson de Daniel Balavoine, c'est à mon tour de te la dédier, car *Dieu que c'est beau* d'avoir une maman comme toi. Merci d'avoir été présente et de m'avoir soutenue à chaque instant de ma vie, et encore plus à celui-là. Merci aussi d'avoir lu (ou essayé du moins) mon tout premier article quand il a été publié !

C'est à la thèse que je dois d'avoir rencontré mon âme sœur. **Christophe**, un grand merci pour ta compréhension et ton soutien de tous les jours. Tu as su faire preuve d'une grande patience et as pris bien soin de moi, surtout ces dernières semaines... Tu es (et sera) toujours *Ma référence* :

« Je dois plus qu'un merci
À celui qui a su combler ma vie »

Résumé

Le renouvellement de la membrane basale et de la matrice extracellulaire lors de processus physiologiques ou pathologiques (réparation tissulaire, angiogenèse, inflammation, cancer) fait intervenir de nombreuses protéases dont les cathepsines à cystéine. Après avoir étudié leur localisation dans l'épiderme à proximité de la jonction dermo-épidermique et leur sécrétion par les kératinocytes, nous avons montré la capacité de la cathepsine S à dégrader efficacement les principales protéines de la membrane basale (laminine, collagène IV, perlécan) et plus particulièrement le nidogène-1, qui est essentiel à l'organisation architecturale de la membrane basale via de multiples interactions avec les autres constituants. Parmi plusieurs glycosaminoglycanes présents dans la matrice extracellulaire, le chondroïtine 4-sulfate est capable de se complexer avec la cathepsine S, via trois sites potentiels de fixation dont un au niveau de son site actif, et d'inhiber son activité enzymatique de façon dose-dépendante. L'expression et l'activité de la cathepsine S au niveau de l'épiderme diminuent au cours du vieillissement cutané, alors que l'expression du nidogène-1 reste stable. La cathepsine S jouerait donc un rôle important aux côtés d'autres protéases dans le remodelage de la membrane basale.

Mots-clés : Cathepsines à cystéine, glycosaminoglycanes, membrane basale, nidogène, peau, vieillissement.

Abstract

Basement membrane (BM) and extracellular matrix (ECM) turnover during physiological or pathological events (tissue repair, angiogenesis, inflammation, cancer) involves numerous proteases including cysteine cathepsins. Cathepsins expression in skin epidermis near dermal-epidermal junction and their secretion by keratinocytes were first analyzed. We showed that cathepsin S degrades efficiently main BM components (laminin, type IV collagen, perlecan) and particularly nidogen-1 that is essential for BM architecture. Among several glycosaminoglycans present in ECM, chondroitin 4-sulfate is able to form a stable complex with cathepsin S. Three predicted binding sites including one closed to its active site were identified. Further, C4-S inhibits cathepsin S activity in a dose-dependent manner. The expression and activity of cathepsin S in epidermis are decreased upon skin aging while nidogen-1 expression remains unchanged. Cathepsin S besides other proteases may play an important role in BM remodeling.

Keywords : Aging, basement membrane, cysteine cathepsins, glycosaminoglycans, nidogen, skin.

Table des matières

Remerciements	5
Résumé	9
Abstract	11
Table des matières	13
Liste des tableaux	15
Liste des figures	17
Introduction	23
I - Revue bibliographique.....	29
1. La peau	31
1.1. Composition de la peau	31
1.1.1. L'épiderme	32
1.1.2. Le derme.....	35
1.2. Fonctions principales de la peau	40
1.2.1. Protection	40
1.2.2. Fonction sensorielle.....	42
1.2.3. Thermorégulation	42
1.2.4. Synthèse hormonale	43
1.3. Vieillessement cutané	44
1.3.1. Vieillessement intrinsèque	44
1.3.2. Photovieillessement	49
1.3.3. Stratégies de lutte anti-âge	53
2. La membrane basale.....	55
2.1. Structure et fonctions	55
2.2. Constituants de la membrane basale	58
2.2.1. Le collagène IV	58
2.2.2. Les laminines.....	59
2.2.3. Les nidogènes.....	61
2.2.4. Le perlécan	63
2.2.5. Autres constituants de la membrane basale.....	64
2.3. Mécanisme d'assemblage de la membrane basale	66
2.4. Altérations de la membrane basale lors du vieillessement	68
2.5. Altérations génétiques de la membrane basale	69

2.5.1. Pathologies génétiques associées au collagène de type IV	70
2.5.2. Pathologies génétiques associées à la laminine.....	71
2.5.3. Pathologies génétiques associées au perlécan	72
2.6. La membrane basale, cible des protéases.....	73
3. Les cathepsines à cystéine.....	77
3.1. Généralités.....	77
3.1.1. Classification et phylogénie	77
3.1.2. Structure	80
3.1.3. Fonctionnement et organisation du site catalytique	83
3.1.4. Spécificité enzymatique des cathepsines à cystéine.....	85
3.1.5. Particularité des exopeptidases.....	85
3.1.6. Localisation cellulaire des cathepsines à cystéine.....	87
3.2. Régulation des cathepsines à cystéine.....	89
3.2.1. Régulation transcriptionnelle	89
3.2.2. Régulation par le pH	90
3.2.3. Régulation par le stress oxydatif	90
3.2.4. Régulation par les glycosaminoglycanes	91
3.2.5. Inhibiteurs endogènes spécifiques : superfamille des cystatines	93
3.2.6. Autres inhibiteurs endogènes non spécifiques	96
3.2.7. Inhibiteurs synthétiques.....	97
3.3. Fonctions physiologiques et pathologiques des cathepsines à cystéine.....	101
3.3.1. Fonctions physiologiques	101
3.3.2. Fonctions physiopathologiques	106
3.4. Cathepsines à cystéine et peau	113
3.4.1. Fonctions physiologiques.....	113
3.4.2. Fonctions physiopathologiques	116
II - Travaux personnels	121
1. Étude de l'hydrolyse des constituants majoritaires de la membrane basale par les cathepsines à cystéine humaines B, K, L et S	125
2. Régulation de l'activité de la cathepsine S par les glycosaminoglycanes.....	157
3. Influence du vieillissement sur l'expression et l'activité des cathepsines à cystéine humaines dans l'épiderme	225
Conclusion générale et perspectives	255
Annexes	305

Liste des tableaux

Tableau 1 : Modifications histologiques observées lors du vieillissement intrinsèque et photo-induit.....	45
Tableau 2 : Nomenclature actuelle des différentes isoformes de laminine.....	60
Tableau 3 : Phénotypes des souris mutantes et maladies génétiques humaines liées à des déficits en protéines de la membrane basale.	69
Tableau 4 : Matricryptines dérivées de la membrane basale.	75
Tableau 5 : Distribution et pathologies associées aux cathepsines à cystéine humaines.....	79
Tableau 6 : Caractéristiques des cathepsines à cystéine humaines.	80
Tableau 7 : Valeurs des constantes d'inhibition (K_i) des inhibiteurs endogènes des cathepsines à cystéine.	93
Tableau 8 : Inhibiteurs thérapeutiques de cathepsines à cystéine en cours de développement clinique.	100

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique de la peau humaine.	31
Figure 2 : Structure des différents glycosaminoglycanes.....	39
Figure 3 : Effets du vieillissement intrinsèque et photo-induit sur la morphologie de la peau et de ses constituants.	48
Figure 4 : Représentation de l’ultrastructure de la jonction dermo-épidermique.	56
Figure 5 : Structure des constituants majoritaires de la membrane basale.....	59
Figure 6 : Mécanisme d’assemblage de la membrane basale.....	67
Figure 7 : Représentation des structures tridimensionnelles de la procathepsine L et de la cathepsine K mature.	82
Figure 8 : Mécanisme catalytique des protéases à cystéine.	84
Figure 9 : Illustration de la nomenclature de Schechter & Berger.	84
Figure 10 : Caractéristiques structurales des cathepsines à cystéine à activité exopeptidasique.	86
Figure 11 : Voies d’adressage des cathepsines à cystéine.	87
Figure 12 : Potentiel de surface des cathepsines K, S, L, B et V.	92
Figure 13 : Localisation des trois régions constituant le site inhibiteur de la superfamille des cystatines.	96
Figure 14 : Structure des principaux inhibiteurs synthétiques des cathepsines à cystéine.	98
Figure 15 : Rôle des protéases à cystéine dans la présentation antigénique par le CMH de classe II.....	102
Figure 16 : Représentation du complexe cathepsine K/C4-S.....	105
Figure 17 : Profil d’expression des cathepsines à cystéine au niveau de l’environnement tumoral.	110
Figure 18 : Rétablissement d’un phénotype capillaire normal chez des souris <i>ctsl^{-/-}</i> , par insertion du gène codant la cathepsine V humaine.	114
Figure 19 : Schéma récapitulatif des rôles connus des cathepsines à cystéine dans l’homéostasie cutanée.	119

Publications liées à la thèse

Articles publiés (revue indexée à comité de lecture) :

- 2011 Cysteine cathepsins: markers and therapy targets in lung disorders (**Annexe 1**)
M. Kasabova, A. Saidi, C. Naudin, **J. Sage**, F. Lecaille & G. Lalmanach
Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism, 9 : 148 – 61
- 2012 Cleavage of nidogen-1 by cathepsin S impairs its binding to basement membrane partners
J. Sage, E. Leblanc-Noblesse, C. Nizard, T. Sasaki, S. Schnebert, E. Perrier, R. Kurfurst, D. Brömme, G. Lalmanach & F. Lecaille
PLoS ONE, 7: e43494

Articles soumis :

- Binding of chondroitin 4-sulfate to cathepsin S regulates its enzymatic activity
J. Sage, F. Mallèvre, F. Barbarin-Costes, S. Samsonov, J. Gehrcke, M. T. Pisabarro, E. Perrier, S. Schnebert, A. Roget, T. Livache, C. Nizard, G. Lalmanach & F. Lecaille
- Aged human skin displays reduced expression and activity of epidermal cathepsin S
J. Sage, D. De Quéral, E. Leblanc-Noblesse, R. Kurfurst, S. Schnebert, E. Perrier, C. Nizard, G. Lalmanach & F. Lecaille
- Cathepsin S inactivates surfactant protein A by cleavage within its carbohydrate recognition domain (**Annexe 2**)
F. Lecaille*, C. Naudin*, **J. Sage**, A. Joulin-Giet, A. Courty, R. Veldhuizen, F. Possmayer & G. Lalmanach
(*contributions égales des auteurs)

Participation à des colloques nationaux et internationaux :

- Communications orales :

- 2010 Degradation of basement membrane proteins by cysteine cathepsins: consequences on protein/ligand-binding activities and BM architecture
J. Sage*, E. Noblesse, C. Nizard, R. Kurfurst, S. Schnebert, E. Perrier, G. Lalmanach & F. Lecaille
Biennial Meeting of American Society for Matrix Biology (ASMB) – Charleston, South Carolina, USA – 24 au 27 octobre 2010
* *Prix de l'International Society for Matrix Biology (ISMB)*

- 2011 Proteolysis of basement membrane by cysteine cathepsins: functional implications
J. Sage, E. Noblesse, R. Kurfurst, C. Nizard, S. Schnebert, G. Lalmanach & F. Lecaille
XIX^{ème} congrès annuel de la Société Française de la Biologie de la Matrice Extracellulaire (SFBMec) – Toulouse, France – 24 au 26 mars 2011
- 2012 Chondroitin 4-sulfate modulates the activity of cathepsin S
J. Sage, F. Mallèvre, F. Barbarin-Costes, S. Samsonov, J. Gehrcke, M. T. Pisabarro, A. Roget, T. Livache, C. Nizard, G. Lalmanach & F. Lecaille
6^{ème} colloque Protéolyse Cellulaire de la Société Française de Biochimie et de Biologie Moléculaire (SFBBM) – Clermont-Ferrand, France – 28 au 30 novembre 2012
- Human cysteine cathepsins: new epidermal markers of skin aging ?
J. Sage, D. De Quéral, E. Leblanc-Noblesse, R. Kurfurst, S. Schnebert, C. Nizard, G. Lalmanach & F. Lecaille
Aging Symposium, Target Meeting – 28 novembre 2012

- Communications par affiches :

- 2010 Cathepsin S may impair nidogen interactions with its binding partners of basement membrane.
J. Sage, E. Noblesse, R. Kurfurst, C. Nizard, G. Lalmanach & F. Lecaille
Journées de Recherche Respiratoire – Nantes, France – 15 & 16 octobre 2010
- 2012 Balancing of cathepsin S activity by glycosaminoglycans
J. Sage, C. Nizard, S. Schnebert, E. Perrier, G. Lalmanach & F. Lecaille
50th Anniversary of the French Society for Extracellular Matrix Biology (SFBMEc) – Paris, France – 29 & 30 mars 2012

- Autre colloque :

- 11th LVMH Symposium – London, Angleterre – 27 octobre 2011

Abréviations

AGE	<i>advanced-glycosylation end products</i>
AP-1	<i>activator protein-1</i>
BM	<i>basement membrane</i>
BPAG2	<i>180-kDa bullous pemphigoid antigen</i>
BPCO	bronchopneumopathie chronique obstructive
C4-S	chondroïtine 4-sulfate
C6-S	chondroïtine 6-sulfate
CA-074	<i>N-(L-3-trans-propylcarbomoyl-oxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline</i>
CLIP	<i>class II-associated invariant chain peptide</i>
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
DPPI	dipeptidylpeptidase I
DS	dermatane sulfate
DTT	dithiotréitol
E-64	<i>L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane</i>
EB	épidermolyse bulleuse
ECM	<i>extracellular matrix</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor recceptor</i>
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
GAG	glycosaminoglycane
HA	acide hyaluronique
HBD	<i>human β-defensin</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HMWK	<i>high molecular weight kininogen</i>
HP	héparine
HS	héparane sulfate
HSPG	héparane sulfate protéoglycane
IFN	interféron
IL	interleukine
IMC	indice de masse corporel
IR	infrarouge
IRF	<i>IFN regulatory factor</i>
IUBMB	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
JAK	<i>janus kinase</i>
JDE	jonction dermo-épidermique
KS	kératane sulfate
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LEKTI	<i>lympho-epithelial kazal-type related inhibitor</i>
LG	<i>laminin globular domain</i>

LHVS	morpholinourea-leucinyl-homophenylalanine-vinylsulfone-phenyl
LLBA	liquides de lavage broncho-alvéolaire
LMWK	<i>low molecular weight kininogen</i>
LN	<i>laminin N-terminal domain</i>
MB	membrane basale
MMP	<i>matrix metalloproteinases</i>
NFkB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NMF	<i>natural moisturizing factor</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PAR	<i>proteinase-activated receptor</i>
PBL	<i>proregion binding loop</i>
RANK	<i>receptor activator of NFkB</i>
RANKL	<i>receptor activator of NFkB ligand</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
SCCA1	<i>squamous cell carcinoma antigen 1</i>
SLPI	<i>secretory leukoprotease inhibitor</i>
Sp	<i>specificity protein</i>
SPARC	<i>secreted protein acidic and rich in cysteine</i>
SPR	<i>small proline rich</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TG	transglutaminase
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TIMP	<i>tissue inhibitors of matrix metalloproteinases</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
UV	ultraviolet
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VS	vinylsulfone

Introduction

L'unité INSERM U618 « Protéases et Vectorisation Pulmonaires » (dirigée par F. Gauthier), recrée cette année UMR 1100 « Pathologies respiratoires : protéolyse et aérosolthérapie » (dirigée par M. Si-Tahar), a pour objectif de caractériser les mécanismes protéolytiques impliqués dans les pathologies respiratoires, afin de développer de nouveaux traitements préventifs et curatifs, en particulier par aérosolthérapie. Les protéases sont des enzymes qui hydrolysent les liaisons peptidiques de protéines. Elles sont classifiées en fonction de leur mécanisme catalytique en six classes majeures : les protéases à sérine, les protéases à cystéine, les métalloprotéases, les protéases à thréonine et les protéases acides à aspartate et à glutamate (pour revue : López-Otín & Bond, 2008). Le groupe de Gilles Lalmanach, que j'ai intégré durant ma thèse, s'intéresse plus particulièrement au rôle et à la régulation des cathepsines à cystéine humaines dans les phénomènes d'inflammations pulmonaires et à l'identification de leurs substrats au niveau de la matrice extracellulaire.

Les cathepsines à cystéine, au nombre de 11 chez l'homme, sont des enzymes lysosomales exprimées dans de nombreux types cellulaires (macrophages, ostéoclastes, cellules épithéliales). Leur fonction principale consiste en la dégradation et le recyclage des protéines intracellulaires au sein des compartiments endosomaux/lysosomaux. Du fait de leur activité à pH acide et de leur rapide inactivation à pH neutre, l'activité extracellulaire des cathepsines sécrétées a longtemps été mésestimée. Cependant, il est à présent bien établi que ces enzymes peuvent sous certaines conditions rester stables et actives dans l'environnement extracellulaire où elles peuvent participer à la dégradation de constituants matriciels aux côtés des protéases à sérine et des métalloprotéases matricielles MMP (pour *matrix metalloproteinases*). En effet, les cathepsines sont capables d'hydrolyser des protéines de la matrice extracellulaire (élastine, collagènes insolubles de type I et II) et de la membrane basale (MB) (collagènes de type IV et XVIII, laminine). La cathepsine K est par ailleurs une collagénase efficace capable de cliver dans la triple hélice des collagènes insolubles, et elle possède également, comme les cathepsines S et V, un potentiel élastinolytique comparable voire supérieur à celui de l'élastase. Cependant, les cibles moléculaires des cathepsines au niveau de la membrane basale n'ont pas toutes été caractérisées. Par exemple, le nidogène, glycoprotéine qui joue le rôle de « clé de voûte » dans l'assemblage de la membrane basale en connectant les réseaux de collagène IV et de laminine, et en intégrant le perlécan et d'autres constituants présents en plus faibles quantités, pourrait être hydrolysé par ces enzymes. Le nidogène est effectivement sensible à la protéolyse des protéases à sérine et des MMP. Malgré ce fait bien établi depuis les années 1990, aucune étude ne s'est intéressée à ce jour à la sensibilité du nidogène vis-à-

vis de l'hydrolyse des cathepsines à cystéine. En plus de leur fonction première, les cathepsines interviennent dans des processus physiologiques plus spécialisés tels que l'activation de précurseurs protéiques, la présentation antigénique et le remodelage du tissu osseux par les ostéoclastes. Du fait de leur fort potentiel protéolytique, les cathepsines doivent être correctement régulées, notamment par leurs inhibiteurs endogènes. En effet, dans le cas contraire, un déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases en faveur de la protéolyse peut conduire à une dégradation excessive de la matrice extracellulaire par les cathepsines, à l'origine de pathologies humaines telles que l'ostéoporose, l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, l'inflammation pulmonaire ou encore l'invasion tumorale. En conditions physiologiques, les cathepsines sont également régulées par leur prorégion, le pH, la température et la présence de glycosaminoglycanes (GAG). En effet, ces molécules, qui sont présentes dans la matrice extracellulaire et à la surface des cellules, peuvent interagir via des liaisons électrostatiques avec les cathepsines et réguler leur stabilité et leur activité protéolytique. Ainsi, la cathepsine B est stabilisée à pH neutre en présence d'héparine et d'héparane sulfate, et la cathepsine K doit sa capacité à cliver la triple hélice des collagènes insolubles de type I et II à la formation d'un complexe stable avec le chondroïtine 4-sulfate. Cependant ce mode de régulation n'est pas caractérisé pour toutes les cathepsines.

Dans le cadre de notre collaboration avec le Département Sciences du Vivant de LVMH Recherche Parfums & Cosmétiques, notre projet s'est axé sur la peau et plus particulièrement sur l'épiderme. En effet, bien que la caractérisation des cathepsines à cystéine au niveau de la peau reste encore partielle, certaines d'entre elles (les cathepsines B, C, K, L, S et V) ont été détectées dans l'épiderme, où elles sont exprimées principalement par les kératinocytes (Schwarz *et al.*, 2002 ; Büth *et al.*, 2004). Les cathepsines sont impliquées dans l'homéostasie cutanée, notamment via la différenciation épidermique et la desquamation, ainsi que dans la présentation antigénique et la cicatrisation cutanée. Elles sont également associées à des pathologies cutanées comme le psoriasis, la dermatite atopique, le syndrome de Papillon-Lefèvre et l'invasion tumorale associée aux mélanomes.

Avec l'augmentation de l'espérance de vie dans les pays développés, l'envie, si ce n'est le besoin, de paraître plus jeune est progressivement apparue. Dans cette optique, l'industrie cosmétique s'évertue à développer des crèmes anti-âge, afin de ralentir et/ou corriger les signes visibles du temps. C'est pourquoi la compréhension des mécanismes du vieillissement cutané a fait l'objet de nombreuses études de la part des laboratoires de recherches universitaires et industriels. Le vieillissement cutané s'accompagne de nombreux

changements : variations hormonales, altération du système anti-oxydant conduisant au stress oxydatif, ou encore déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases en faveur de la protéolyse. En effet, avec l'âge et sous l'effet des irradiations ultraviolettes (UV) provenant du rayonnement solaire, certaines protéases (MMP, protéases à sérine) sont sur-exprimées par les cellules de la peau (fibroblastes et kératinocytes), et sont moins bien régulées par leurs inhibiteurs endogènes. Ces protéases sont responsables de la dégradation excessive et la désorganisation des réseaux de collagène et d'élastine du derme et de la membrane basale, à l'origine de la formation de rides et de la perte d'élasticité de la peau observées au cours du vieillissement. L'implication des cathepsines à cystéine dans ce processus n'a cependant jamais été reportée malgré leur capacité à dégrader les constituants matriciels.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont consisté à examiner la capacité des cathepsines à cystéine à dégrader les protéines de la membrane basale, caractériser leur mode de régulation par des glycosaminoglycanes, et étudier le statut des cathepsines à cystéine dans l'épiderme durant le vieillissement cutané. Dans un premier temps, nous avons cherché à identifier les cibles moléculaires des cathepsines à cystéine au niveau de la membrane basale. Notre attention a porté sur la cathepsine S, dont la particularité est de rester active et stable à pH neutre, pH retrouvé au niveau de la jonction dermo-épidermique (JDE). L'organisation structurale de la membrane basale reposant sur des interactions entre ses différents constituants, nous avons étudié les effets de leur hydrolyse, et plus particulièrement celle du nidogène, par la cathepsine S sur l'intégrité architecturale de la membrane basale. En parallèle, nous avons étudié la régulation de l'activité protéolytique de la cathepsine S par différents glycosaminoglycanes. Comme cela a déjà été décrit pour d'autres cathepsines (cathepsines B, K, V et X), notre étude montre par diverses approches biochimiques que l'activité de la cathepsine S est modulée par certains glycosaminoglycanes. D'autre part, nous nous sommes intéressés à l'influence de l'âge et de la photo-exposition sur l'expression des cathepsines et de leurs inhibiteurs dans l'épiderme et des constituants de la membrane basale et de la matrice extracellulaire, à partir de peaux issues de donneurs sains d'origine Caucasienne. Le vieillissement cutané s'accompagne de variations de l'expression et de l'activité de certaines cathepsines, dont la cathepsine S.

I - Revue bibliographique

1. La peau

1.1. Composition de la peau

La peau est l'organe le plus étendu du corps humain (environ 2 m² de surface chez l'adulte) et représente environ 8 % de la masse corporelle. C'est la première ligne de défense de l'organisme contre l'environnement extérieur (micro-organismes, radiations). Elle est composée de deux principales couches de tissu : un tissu d'origine épithéliale en surface, l'épiderme, et un tissu conjonctif situé plus en profondeur, le derme (**Figure 1A**). L'hypoderme, dans le prolongement du derme, assure l'interface entre la peau et les tissus qu'elle recouvre (muscles, os). Les cellules de l'épiderme forment des crêtes épidermiques qui se projettent dans le derme, et ce dernier présente également des projections dans l'épiderme, appelées papilles dermiques. Ces structures permettent d'augmenter la surface de contact et d'adhésion entre les deux compartiments. L'épiderme est séparé du derme par une membrane basale, nommée jonction dermo-épidermique. La membrane basale fait l'objet d'une section à part entière (voir Chapitre 2). On trouve également dans la peau des annexes cutanées telles que les poils, les glandes sébacées qui produisent le sébum et les glandes sudoripares à l'origine de la sueur (pour revue : Prost-Squarcioni, 2006).

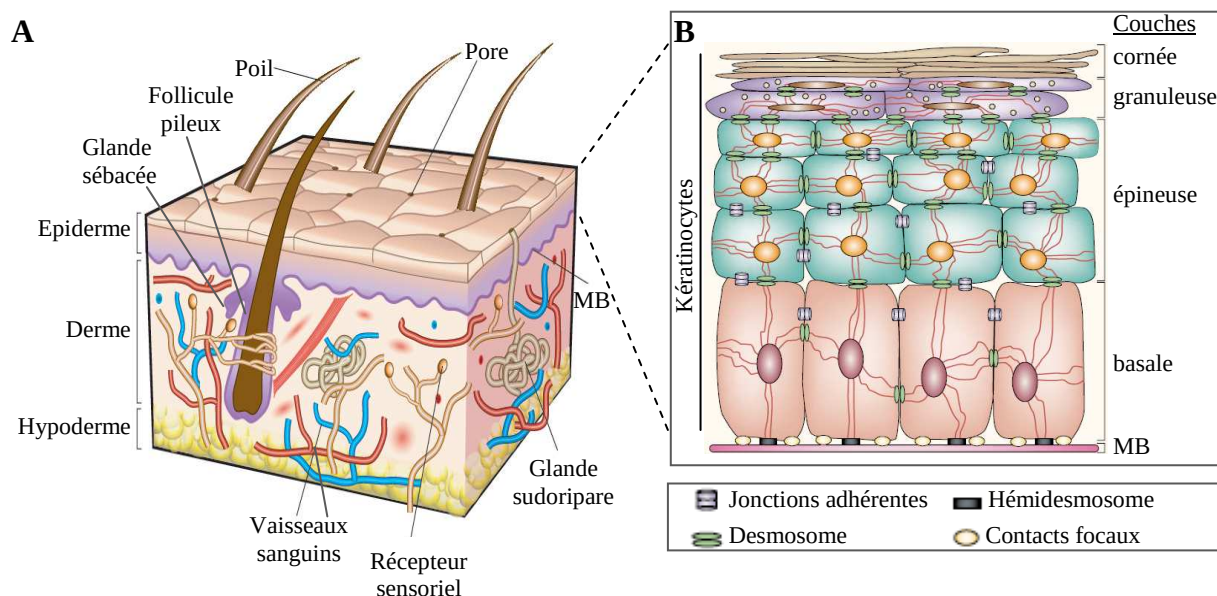


Figure 1 : Représentation schématique de la peau humaine.

A) Illustration des différentes couches de la peau et des annexes cutanées (d'après MacNeil, 2007). B) Représentation des différentes couches de cellules qui forment l'épiderme (d'après Fuchs & Raghavan, 2002).

1.1.1. L'épiderme

L'épiderme est un épithélium pluristratifié et kératinisé (**Figure 1A/B**). Son épaisseur moyenne est de 100 μm , mais peut varier de 50 μm sur les paupières jusqu'à 1 mm au niveau de la paume des mains et de la plante des pieds. L'épiderme est constitué en grande majorité de kératinocytes, qui suite à un processus de différenciation épidermique vont permettre de former plusieurs couches, qui diffèrent par leur structure et leur composition. L'épiderme renferme de nombreuses terminaisons nerveuses libres mais ne possède pas de vaisseaux sanguins, il est donc dépendant du derme qui l'alimente en nutriments par diffusion.

1.1.1.1. Les cellules constitutives de l'épiderme

Les kératinocytes sont le type cellulaire qui prédomine dans l'épiderme (90 %) (McGrath *et al.*, 2008). Ce sont des cellules riches en protéines, composées de kératine et de grains de kératohyaline. Les kératines s'assemblent en tonofilaments et forment le cytosquelette des kératinocytes en s'associant aux filaments d'actine et aux microtubules. Les kératines sont des protéines fibreuses insolubles dans l'eau, qui vont assurer à la peau sa propriété d'imperméabilité. Durant la différenciation épidermique aboutissant à la cornification, processus essentiel à la fonction barrière de la peau, les kératinocytes vont migrer à travers toutes les couches de l'épiderme pour rejoindre la surface. Ils vont alors subir d'importantes modifications tant dans leur structure que dans leur composition, qui seront détaillées plus loin.

Les mélanocytes (3 à 5 % de la population cellulaire épidermique) sont présents uniquement dans la couche basale de l'épiderme et dans le follicule pileux, mais ils possèdent des dendrites leur permettant d'atteindre les kératinocytes des couches supérieures. Ces cellules synthétisent la mélanine, responsable de la pigmentation de la peau, dans des organites spécialisés (les mélanosomes), qui vont ensuite être transférés au sein des kératinocytes. La différence de couleur de peau n'est pas liée au nombre de mélanocytes présents dans l'épiderme, mais à leur niveau d'activité, donc à la quantité de mélanine produite, ainsi qu'au type de mélanine synthétisée. En effet, la mélanine est en réalité un complexe d'eumélanine, un pigment brun foncé, et de phéomélanine, un pigment plus clair, jaune orangé ; et c'est le ratio entre ces deux pigments qui confère à la peau sa palette de couleurs variées. Ces deux types de mélanines sont issus de la transformation de l'acide aminé tyrosine, dont l'étape clé est l'oxydation par la tyrosinase. L'albinisme est une maladie génétique due à des mutations dans les gènes codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse de la mélanine,

notamment la tyrosinase, ce qui résulte en une absence ou une diminution de la pigmentation de la peau, des yeux, des cheveux et des poils (pour revue : Summers, 2009).

Les cellules de Langerhans, qui sont retrouvées préférentiellement au niveau de la couche épineuse, représentent 2 à 4 % des cellules épidermiques (pour revue : Valladeau, 2006). Produites dans la moelle osseuse, ces cellules dendritiques sont les cellules de défense de l'épiderme, permettant la phagocytose de micro-organismes et de particules étrangères. De plus, les cellules de Langerhans sont capables d'initier la réponse immunitaire, en présentant les antigènes aux lymphocytes T présents au niveau des ganglions lymphatiques.

Les cellules de Merkel constituent la population cellulaire minoritaire de l'épiderme. Elles sont localisées dans la couche basale au contact des terminaisons nerveuses libres (pour revue : Halata *et al.*, 2003). Ce sont des récepteurs sensoriels impliqués dans la fonction du toucher. Elles peuvent être isolées ou regroupées en amas, formant les corpuscules de Merkel.

1.1.1.2. La différenciation épidermique

Les kératinocytes se différencient et migrent de la couche basale jusqu'à la couche cornée où ils desquament (**Figure 1B**). Ce processus de différenciation épidermique dure environ 28 jours : 14 jours pour que les kératinocytes de la couche basale se différencient en cornéocytes de la couche cornée (cornification), puis 14 jours pour que ces derniers soient évacués de la surface de la peau par desquamation. L'épiderme est donc un tissu en perpétuel renouvellement, l'homéostasie cutanée reposant sur l'équilibre entre différenciation cellulaire et desquamation (pour revue : Fuchs & Raghavan, 2002).

La couche basale (ou *stratum basale*) est formée d'une rangée unique de cellules cylindriques ou cubiques de petites tailles. Les kératinocytes basaux sont ancrés à la membrane basale via des jonctions serrées telles que les hémidesmosomes, et sont reliés entre eux par des desmosomes. Leur cytosquelette renferme des filaments intermédiaires de kératine qui sont organisés en tonofilaments autour du noyau et sont reliés aux hémidesmosomes et aux desmosomes. Dans cette couche, on retrouve principalement les kératines K5 et K14 (Nelson & Sun, 1983). En plus des filaments de kératine, le cytosquelette contient des microtubules et des filaments d'actine. Les kératinocytes basaux dérivent de cellules souches multipotentes, provenant de niches situées dans la couche basale ainsi que dans une zone du follicule pileux nommée le bulge (Blanpain & Fuchs, 2006). Les cellules souches expriment spécifiquement les kératines K15 et K19, qui peuvent ainsi être utilisées comme marqueur de cette sous-population de cellules (Michel *et al.*, 1996). Les kératinocytes basaux subissent un nombre de

divisions limité, puis la division s'arrête et ces cellules commencent à se différencier tandis qu'elles quittent la couche basale pour rejoindre la couche supérieure.

La couche épineuse (ou *stratum spinosum*) est constituée de cinq à dix couches cellulaires superposées. Elle doit son nom aux nombreux desmosomes qui joignent les kératinocytes, leur conférant un aspect épineux en microscopie optique. Ces cellules s'aplatissent au fur et à mesure qu'elles s'éloignent de la couche basale. Les kératinocytes de cette couche synthétisent les kératines K1 et K10, qui vont remplacer les kératines K5 et K14 de la couche basale (Woodcock-Mitchell *et al.*, 1982). Les filaments intermédiaires de kératine y sont plus abondants et mieux organisés que dans la couche basale. Ces cellules produisent également des protéines riches en glutamine et en lysine, comme l'involucrine, qui vont s'accumuler au niveau de la face interne des membranes plasmiques (Rice & Green, 1979).

La couche granuleuse (ou *stratum granulosum*) comprend une à trois couches de kératinocytes aplatis, disposés parallèlement à la surface de la peau. La présence de grains de kératohyaline dans le cytoplasme des kératinocytes est à l'origine du nom attribué à cette couche. Ces grains correspondent à des agrégats protéiques insolubles, composés essentiellement de profilaggrine et de loricrine (Steven *et al.*, 1990). On retrouve également dans le cytoplasme de ces cellules des corps lamellaires ou kératinosomes, organites qui produisent des lipides (céramides, cholestérol et acides gras), des peptides antimicrobiens (β -défensines et cathélicidines), et des protéines constituant les cornéodesmosomes (cornéodesmosine). Les corps lamellaires synthétisent également différentes protéases telles que les kallikréines KLK5, KLK7 et KLK14 (protéases à sérine), la cathepsine D (protéase acide) et la cathepsine V (protéase à cystéine) ; ainsi que des inhibiteurs de protéases comme LEKTI (pour *lympho-epithelial kazal-type related inhibitor*, inhibiteur des protéases à sérine) et les cystatines A et M/E (inhibiteurs des protéases à cystéine) (Ishida-Yamamoto & Kishibe, 2011). À l'interface entre la couche granuleuse et la couche cornée, ces corps lamellaires fusionnent avec la membrane plasmique des kératinocytes, et leur contenu se répand dans l'espace intercellulaire (Madison, 2003). Les kératinocytes sont en phase de différenciation terminale, ils perdent alors leurs noyaux et leurs organites cytoplasmiques, et le contenu des granules de kératohyaline se déverse dans le cytoplasme. Les cellules anucléées et aplaties ainsi obtenues sont nommées cornéocytes.

La couche cornée (ou *stratum corneum*) est formée de cinq à dix strates de cornéocytes, pouvant aller jusqu'à trente couches dans les régions palmoplantaires. La membrane plasmique des cellules est remplacée par une coque rigide, l'enveloppe cornée, qui confère aux cornéocytes résistance et imperméabilité (pour revue : Candi *et al.*, 2005). L'enveloppe

cornée est constituée de protéines provenant des granules de kératohyaline (profilaggrine, loricrine) et de protéines cytoplasmiques (involucrine, protéines SPR pour *small proline rich*, cystatine A, élafine) (Steven & Steinert, 1994 ; Kalinin *et al.*, 2002). Ces protéines sont liées de façon covalente au niveau de leurs résidus lysine et glutamine par les transglutaminases TG1, TG2 et TG5 (pour revue : Eckert *et al.*, 2005). La filaggrine, obtenue par clivage protéolytique de la profilaggrine, va permettre d'agréger les filaments de kératine en macrofibrilles, ce qui confère la résistance mécanique de la couche cornée (Dale *et al.*, 1978). La dégradation protéolytique de la filaggrine génère des facteurs naturels d'hydratation (NMF, pour *natural moisturizing factor*), constitués d'acides aminés libres et de leurs dérivés. Ces humectants naturels, de par leurs propriétés hygroscopiques, peuvent capter des molécules d'eau, contribuant ainsi à l'hydratation de la couche cornée (pour revue : Rawlings & Harding, 2004). L'espace intercellulaire est quant à lui comblé par des lipides provenant des corps lamellaires, ce qui permet une meilleure cohésion des cornéocytes et empêche la déshydratation (Bouwstra & Ponc, 2006). Ces lipides peuvent s'attacher à la surface des cornéocytes via les protéines de l'enveloppe cornée, notamment l'involucrine, pour former une enveloppe lipidique externe (Marekov & Steinert, 1998). Le concept de « briques et mortiers » est par ailleurs utilisé pour décrire la morphologie de la couche cornée, avec les cornéocytes dans le rôle des briques et la matrice lipidique représentant le mortier (Elias, 1983). Les cornéodesmosomes, desmosomes spécialisés, sont des jonctions qui permettent la cohésion entre les cornéocytes, formant ainsi la barrière de la peau. Au fur et à mesure de la migration de ces squames à la surface de l'épiderme, les différentes structures (matrice lipidique, cornéodesmosomes, filaments de kératine) vont se désorganiser. Les cornéodesmosomes étant à l'origine de la cohésion cellulaire, leur désorganisation, due à l'action d'enzymes protéolytiques (kallikréines KLK5, KLK7 et KLK14, et cathepsines D et V) libérées par les corps lamellaires va permettre l'élimination des cellules mortes de la couche la plus externe de la peau, correspondant à la desquamation (pour revue : Ishida-Yamamoto & Kishibe, 2011).

1.1.2. Le derme

Le derme est un tissu conjonctif dense, constitué de cellules et de matrice extracellulaire contenant des fibres élastiques et de collagènes. Il a une épaisseur moyenne de 1 à 2 mm (3 à 4 mm pour les régions palmoplantaires). C'est dans le derme que l'on retrouve les annexes cutanées (poils, glandes sébacées et sudoripares), mais aussi les vaisseaux sanguins qui

apportent les nutriments et le système de défense du derme via les leucocytes. C'est également dans ce compartiment que se trouvent les fibres nerveuses et les récepteurs sensoriels. Il est constitué de deux zones distinctes : le derme papillaire, sous-jacent à la membrane basale, et le derme réticulaire, situé plus en profondeur.

Le derme papillaire est un tissu conjonctif lâche, constitué d'un réseau fin de collagènes fibreux (de type I et III) et de fibres élastiques (de type oxytalane) orientées perpendiculairement à la membrane basale. Ces fibres baignent dans une matrice extracellulaire composée de protéoglycanes et de glycosaminoglycanes. Cette partie du derme contient les vaisseaux sanguins et les cellules.

Le derme réticulaire, qui représente la majeure partie du derme, est un tissu conjonctif beaucoup plus dense, formé principalement de fibres de collagènes réunies en faisceaux et de fibres élastiques, entremêlées et orientées parallèlement à la membrane basale. Cette partie du derme contient peu de cellules et de matrice extracellulaire.

1.1.2.1. Les cellules du derme

Les fibroblastes sont les cellules majoritaires du derme. Ce sont de grandes cellules fusiformes, qui synthétisent de nombreuses protéines, en particulier les protéines formant la matrice extracellulaire (collagènes, élastine, protéoglycanes), mais aussi des protéases (collagénases, élastases) capables de dégrader la matrice extracellulaire afin de la renouveler ou de la réparer.

On trouve également dans le derme des cellules d'origine sanguine, telles que des cellules dendritiques, des mastocytes et des macrophages, qui interviennent dans l'inflammation et la réponse immunitaire, et permettent notamment la cicatrisation cutanée.

Enfin, dans le derme se trouvent des cellules associées aux annexes cutanées et vaisseaux sanguins comme des cellules endothéliales, cellules nerveuses, etc.

1.1.2.2. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est constituée d'un réseau de fibres insolubles de collagène et d'élastine qui sont entourées d'un gel hautement hydraté, la substance fondamentale, dû à la présence de protéoglycanes et de GAG.

Les collagènes sont les protéines les plus abondantes du derme (70 à 80 %) (van der Rest & Garrone, 1991). Ils sont constitués de trois chaînes α , identiques ou non, enroulées sur elles-mêmes en une triple hélice formant le domaine collagénique, caractéristique de cette famille de protéines (pour revue : Ricard-Blum, 2011). Cette structure particulière est rendue possible

grâce à la présence de triplets Gly-X-Y, où le plus souvent X est une proline et Y une hydroxyproline. Actuellement, il a été identifié 28 collagènes différents, et ces molécules présentent une grande diversité tant dans leur structure que dans leur distribution. La matrice dermique est composée principalement de fibres de collagènes de type I (70-80 %) et de type III (15-20 %), et dans une moindre mesure de collagène de type V (2-5 %) (Smith *et al.*, 1986). Les collagènes fibrillaires sont sécrétés sous forme de procollagènes, dont les extrémités (télopeptides) sont clivées par des procollagénases. C'est au niveau de ces télopeptides qu'a lieu ensuite l'association covalente de ces collagènes en fibres via l'action de lysyl oxydases. Ces enzymes permettent le pontage de deux molécules de collagène via les chaînes latérales de leurs résidus lysines. Ce sont les fibres de collagènes qui confèrent au derme sa résistance mécanique.

L'élastine est le constituant principal des fibres élastiques (pour revue : Kielty *et al.*, 2002). Elle est synthétisée sous la forme d'un monomère soluble de 72 kDa, appelé tropoélastine. Les fibres élastiques sont constituées de plusieurs monomères de tropoélastine, liés ensemble par des liaisons hydrogènes et covalentes, notamment par des lysyl oxydases, et qui sont entourés de microfibrilles de fibrilline (Kagan & Sullivan, 1982). Ce sont ces fibres qui confèrent à la peau son élasticité et sa résilience (capacité de revenir à sa forme initiale après avoir été étirée). L'élastine est une protéine très résistante à la protéolyse, dont le renouvellement est quasi-nul, son temps de demi-vie étant estimé à 70 ans (pour revue : Vrhovski & Weiss, 1998). Dans la peau, le réseau élastique comprend trois types de fibres : les fibres oxytalanes, d'élaunine et élastiques (Cotta-Pereira *et al.*, 1976). Les fibres oxytalanes, les plus superficielles, forment de fines arborisations perpendiculaires à la JDE. Elles s'entremêlent avec les fibres d'élaunine dans le derme papillaire, tandis que les fibres élastiques sont plus épaisses et orientées parallèlement à la JDE dans le derme réticulaire. Leur composition varie : les fibres oxytalanes étant essentiellement constituées de fibrilline, tandis que dans le derme profond, les fibres élastiques sont plus riches en élastine.

La matrice extrafibrillaire ou substance fondamentale est composée de GAG, le plus souvent associés à des protéoglycanes, de glycoprotéines de structure et d'eau.

Les glycoprotéines de structure comme la fibronectine et la ténascine, sont des molécules impliquées dans les interactions matrice-cellules, notamment par l'intermédiaire de récepteurs cellulaires, les intégrines. Elles sont entre autres responsables de l'adhésion et la migration cellulaire. La fibrilline quant à elle est une glycoprotéine nécessaire à l'ancrage des fibres élastiques dans le derme (Sakai *et al.*, 1991).

Les glycosaminoglycanes sont des polysaccharides linéaires sulfatés chargés négativement, dont la masse moléculaire varie entre 10 et 100 kDa (pour revue : Gandhi & Mancera, 2008). Ils sont composés de répétitions d'unités disaccharidiques, constituées d'un acide uronique (D-acide glucuronique ou L-acide iduronique) et d'un osamine (D-galactosamine ou D-glucosamine). Il en existe plusieurs, qui diffèrent par leur composition en disaccharide, le positionnement et le nombre de leurs sulfates (**Figure 2**) : l'héparine (HP), l'héparane sulfate (HS), les chondroïtines 4- et 6- sulfate (C4-S et C6-S), le dermatane sulfate (DS) et le kératane sulfate (KS). Tous les GAG sont associés à la surface des cellules ou greffés de façon covalente à des protéines, les protéoglycanes ; à l'exception de l'acide hyaluronique (HA), GAG non sulfaté de très haut poids moléculaire (jusqu'à 8000 kDa). Dans le derme, on retrouve principalement les chondroïtines sulfates, l'héparane sulfate, le dermatane sulfate et le kératane sulfate ; greffés à des protéoglycanes tels que le perlécan et le versican. L'acide hyaluronique est également retrouvé en grande quantité dans la matrice extrafibrillaire. Il est à noter que ces GAG sont également présents dans l'épiderme, au niveau de l'espace intercellulaire ; l'acide hyaluronique étant le plus abondant (King, 1981 ; Brown & Parkinson, 1983). Ces molécules, de par leurs nombreuses charges négatives, sont de véritables éponges et ont la capacité de fixer des molécules d'eau, contribuant ainsi à l'hydratation de la peau. Elles sont ainsi capables de retenir plus de 1000 fois leur poids en eau. L'acide hyaluronique est par ailleurs utilisé dans l'industrie cosmétique et en médecine esthétique comme produit de comblement des rides, également nommés « fillers ». Les GAG peuvent se lier à de nombreuses molécules, protéines, protéases, facteurs de croissance et cytokines, et jouent un rôle important dans le contrôle du comportement cellulaire et de certains processus biologiques. Par exemple, l'héparine, molécule la plus négativement chargée de l'organisme, empêche la coagulation sanguine, via sa fixation à l'antithrombine (Casu *et al.*, 2004). Elle est donc couramment utilisée comme anticoagulant dans l'industrie pharmaceutique, notamment pour traiter des affections comme la thrombose. L'acide hyaluronique, quant à lui, est impliqué dans la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire, via sa fixation à des récepteurs membranaires tels que le CD44 (pour revue : Nusgens, 2010). Il est également capable de stimuler la synthèse de collagène et joue un rôle important dans la cicatrisation cutanée (Frenkel, 2012). En effet, l'acide hyaluronique intervient dans chaque étape de la cicatrisation, notamment en recrutant des cellules pro-inflammatoires via la stimulation de cytokines et des fibroblastes pour reformer la matrice extracellulaire, et en permettant la ré-épithélialisation de la blessure.

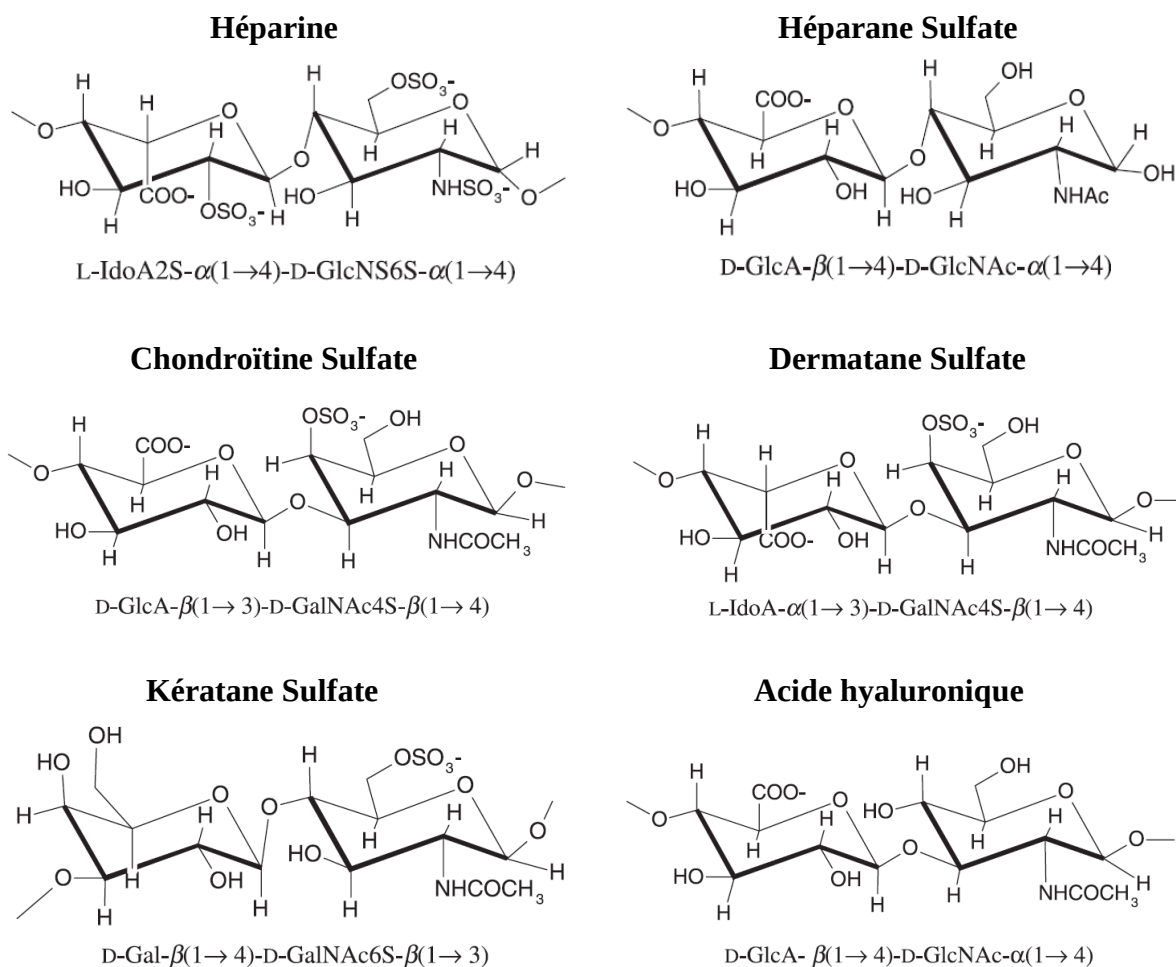


Figure 2 : Structure des différents glycosaminoglycane.

D-GlcA : acide D-glucuronique ; L-IdoA : acide L-iduronique ; D-Gal : D-Galactose ; D-GalNAc : D-N-acétylgalactosamine ; D-GlcNAc : D-N-acétylglucosamine (d'après Gandhi & Mancera, 2008).

1.2. Fonctions principales de la peau

1.2.1. Protection

La peau protège l'organisme des agressions mécaniques (chocs, pressions) et chimiques, des radiations et des agents pathogènes. Ce sont l'élasticité, la solidité et la cohésion cellulaire de toutes les structures composant la peau qui lui permettent de protéger l'organisme contre les stress mécaniques. L'hypoderme via ses graisses joue notamment le rôle d'amortisseur contre les chocs.

1.2.1.1. Protection contre les radiations solaires

Le rayonnement solaire émet différents types de radiations : le rayonnement ultraviolet (UV), dont la longueur d'onde est inférieure à 400 nm, la lumière visible, entre 400 et 700 nm, et le rayonnement infrarouge (IR) dont la longueur d'onde est supérieure à 700 nm. Le spectre ultraviolet peut être décomposé en UVC (200-280 nm), UVB (280-320 nm) et UVA (320-400 nm). Les UVC sont des rayonnements très toxiques pour l'homme, mais qui sont entièrement filtrés par la couche d'ozone (pour revue : Maverakis *et al.*, 2010). La plus grande partie des radiations UV qui atteignent la surface de la terre sont les UVA (95 %), mais les UVB, bien que moins nombreux, ont beaucoup plus d'énergie et sont responsables des coups de soleil. Les UVB traversent la couche cornée et sont arrêtés au niveau de l'épiderme, tandis que les UVA ont un pouvoir plus pénétrant et peuvent atteindre les couches profondes du derme, à l'origine du photovieillissement. La peau est protégée du rayonnement solaire via deux mécanismes : l'épaississement de la couche cornée, qui agit comme un filtre naturel, et la stimulation de la synthèse de mélanine dans l'épiderme, à l'origine de la pigmentation de la peau. Les irradiations UV émettent de l'énergie qui peut être absorbée par les molécules de la peau et les modifier chimiquement : c'est notamment le cas de l'ADN. De plus, cette énergie peut générer des espèces réactives de l'oxygène (ROS pour *reactive oxygen species*), radicaux libres qui vont également être à l'origine de dommages de l'ADN (Maverakis *et al.*, 2010). Il en résulte la formation de dimères de thymidines, qui peuvent normalement être réparés par le système de réparation de l'ADN, par excision ou par photoréactivation de ces dimères. L'absorption des rayons UV par l'ADN entraîne l'accumulation de mutations génétiques, qui si elles sont trop nombreuses peuvent conduire à la transformation en cellules cancéreuses. La formation des dimères de thymidines ainsi que la mise en place du système de réparation de l'ADN sont deux signaux qui vont avoir pour effet de stimuler la production de mélanine

(pour revue : Lin & Fisher, 2007). La pigmentation est donc un mécanisme de défense de l'organisme suite à des lésions de l'ADN UV-dépendantes. La mélanine joue un rôle protecteur contre les UV en absorbant les photons et en les dissipant sous forme de chaleur, ce qui limite la génération de radicaux libres et donc les dommages de l'ADN, l'oxydation des protéines et des lipides membranaires. Suite à une irradiation UV, la mélanine est ainsi retrouvée en périphérie du noyau des kératinocytes, sorte « d'ombrelle » protégeant la cellule des effets nocifs du rayonnement solaire. Cependant, ces mécanismes naturels ne protègent pas d'une exposition solaire prolongée.

1.2.1.2. Protection contre les pathogènes

La fonction barrière de la peau est principalement assurée par la couche la plus superficielle de la peau, la couche cornée. En plus de limiter les pertes en eau, cette barrière protège l'organisme contre l'entrée d'agents pathogènes. La défense antimicrobienne de la peau est permise par le pH acide de la couche cornée et la présence de peptides antimicrobiens. En effet, il existe un gradient de pH dans l'épiderme entre la couche la plus profonde, la couche basale, où le pH est de 7,5, et la couche cornée dont le pH est de 4,5 (Ohman & Vahlquist, 1994). L'acidité de cette couche permet le développement de la microflore naturelle tout en permettant d'inhiber la croissance de certaines bactéries pathogènes telles que *Staphylococcus aureus* dont la division s'effectue mieux à pH neutre (Schmid-Wendtner & Korting, 2006). De plus, les cellules de l'épiderme synthétisent des peptides antimicrobiens qui, de par leurs propriétés antibiotiques, vont éliminer un large spectre de micro-organismes (bactéries, virus, champignons) (pour revue : Guaní-Guerra *et al.*, 2010). Les défensines et les cathélicidines sont les deux familles de peptides antimicrobiens retrouvés au niveau de la peau (Braff *et al.*, 2005). Les kératinocytes synthétisent de façon constitutive et inductible la cathélicidine LL-37, et les β -défensines HBD1, HBD2 et HBD3 (pour *human β -defensin*) ; l'expression de la cathélicidine étant fortement stimulée par la vitamine D3 (Gombart *et al.*, 2005), et celle de la β -défensine HBD2 par l'IFN- γ (pour *interféron-gamma*), le TNF- α (pour *tumor necrosis factor-alpha*) et les bactéries elles-mêmes (Lai & Gallo, 2009). Ces peptides antimicrobiens s'enchâssent dans la membrane des bactéries en formant des pores, ce qui conduit à la fuite cytoplasmique et la mort de ces cellules. En plus de leur propriété bactéricide directe, les peptides antimicrobiens participent au système immunitaire cutané via le recrutement de neutrophiles, monocytes et lymphocytes T. De plus, d'autres protéines de la couche cornée interviennent dans la défense antimicrobienne cutanée, notamment des inhibiteurs de protéases à cystéine (cystatines A et M/E) et de protéases à sérine (élafine et LEKTI)

(Ishida-Yamamoto & Kishibe, 2011). En effet, en plus de réguler l'activité des protéases endogènes, ces inhibiteurs peuvent contrôler l'activité de protéases libérées par des pathogènes.

1.2.2. Fonction sensorielle

Les terminaisons nerveuses contenues dans la peau, nombreuses notamment au niveau du bout des doigts, confèrent à cet organe le sens du toucher. La peau est ainsi sensible à l'effleurement, la pression, la température et la douleur. Pour cela, il existe des récepteurs sensoriels spécifiques qui, suite aux différents stimuli, vont transmettre les informations au cerveau. Il s'agit de mécanorécepteurs qui sont sensibles soit à l'effleurement et au contact léger (corpuscules de Meissner et de Merkel, terminaisons libres de l'épiderme) soit à des pressions plus fortes (corpuscules de Ruffini et de Pacini). Les thermorécepteurs, eux, sont sensibles aux variations de la température cutanée : ce sont les corpuscules de Krause (qui détectent le froid, entre 10 et 30 °C) et de Ruffini (qui détectent le chaud, entre 30 et 46 °C). Enfin, les terminaisons libres situées dans l'épiderme permettent d'activer les récepteurs à la douleur (nocirécepteurs) suite à une brûlure, une piqûre ou un pincement.

1.2.3. Thermorégulation

La peau, notamment via ses annexes, est impliquée dans la régulation de la température corporelle. En effet, une température d'environ 37 °C est nécessaire pour le fonctionnement optimal des protéines et des activités enzymatiques. Les poils et le tissu adipeux (hypoderme) servent d'isolant contre le froid. Chaque poil est associé à un petit muscle, le muscle horripilateur, qui intervient dans la thermorégulation. En effet, tous les muscles horripilateurs peuvent se contracter ensemble sous le froid. Ce phénomène, connu sous le nom de « chair de poule », génère un faible dégagement de chaleur à la surface de la peau, qui va constituer une couche d'air isolante. De plus, la peau contient de nombreux vaisseaux sanguins, qui se contractent sous l'effet du froid, afin de limiter les pertes thermiques. Au contraire lorsqu'il fait chaud, ces vaisseaux sanguins se dilatent, permettant le transfert de chaleur à l'environnement par radiation. De même, le processus de sudation, via la production de sueur par les glandes sudoripares, contribue à éliminer l'excédent de chaleur par évaporation.

1.2.4. Synthèse hormonale

La vitamine D est un élément indispensable à l'absorption du calcium et du phosphore par les intestins, ce qui permet leur fixation au niveau des os. L'organisme peut obtenir de la vitamine D par l'alimentation (poissons gras, œufs, beurre), ou la synthétiser de façon endogène, réaction qui nécessite une exposition solaire. En effet, ce sont les rayons solaires UVB qui permettent la transformation du 7-déshydrocholestérol, un dérivé du cholestérol, en vitamine D3 dans les kératinocytes. Les peaux les plus foncées, de par l'effet protecteur de la mélanine contre les UV, ont une capacité amoindrie de synthèse de la vitamine D3 par rapport à des peaux plus claires (Clemens *et al.*, 1982). En plus de son action sur le squelette, la vitamine D régule la prolifération et la différenciation des kératinocytes (pour revue : Bikle, 2011). Des dérivés de vitamine D sont ainsi prescrits en application locale pour traiter le psoriasis, désordre cutané résultant d'une différenciation épidermique accélérée (Kim, 2010).

1.3. Vieillissement cutané

Le vieillissement de la peau est un phénomène physiologique normal (vieillissement intrinsèque ou chronovieillissement), que subissent tous les organes du corps humain, auquel s'ajoute les effets délétères de l'environnement, essentiellement l'exposition solaire (vieillissement extrinsèque ou photovieillissement). Bien que l'on puisse distinguer les caractéristiques morphologiques observées entre chrono- et photovieillissement, les deux types de vieillissement partagent certains mécanismes. Cependant, le vieillissement photo-induit exacerbe et accélère les effets du chronovieillissement (pour revue : Kohl *et al.*, 2011 ; Naylor *et al.*, 2011).

1.3.1. Vieillissement intrinsèque

Le vieillissement intrinsèque cause des altérations structurales et fonctionnelles dans toutes les couches de la peau (**Tableau 1**). Dans l'épiderme, le taux de renouvellement des kératinocytes diminue avec l'âge passant de 28 jours pour la peau jeune, à 40-60 jours pour la peau âgée (Grove & Kligman, 1983). La peau s'amincit et est plus fragile, sa fonction barrière n'est plus correctement assurée. Cela conduit à une augmentation de la susceptibilité aux infections et à une perte de l'hydratation, notamment via une diminution de la filaggrine et donc des facteurs naturels d'hydratation (Rawlings & Harding, 2004). On observe également une diminution d'environ 50 % des cellules de Langerhans chez des sujets âgés, ce qui compromet la capacité de surveillance immunitaire de la peau (Gilchrest *et al.*, 1982). Le derme est également affecté par le chronovieillissement, les fibroblastes sont moins nombreux et leur activité est réduite. Il y a donc moins de synthèse de collagène et d'élastine, résultant en l'apparition de fines rides, une moins bonne élasticité et une cicatrisation ralentie. La microvasculature est également moins dense, ce qui réduit l'apport de nutriments et conduit à l'atrophie des cellules de la peau et des annexes. La peau est sèche suite à la diminution de production de sébum par les glandes sébacées. Plusieurs facteurs impliqués dans le chronovieillissement sont détaillés ci-après.

Tableau 1 : Modifications histologiques observées lors du vieillissement intrinsèque et photo-induit.

(d'après Passeron & Ortonne, 2003 ; Zouboulis & Makrantonaki, 2011)

		Chronovieillissement	Photovieillissement
Epiderme	Épaisseur générale	Amincissement	Épaississement
	Kératinocytes	Nombre réduit, prolifération altérée	Prolifération altérée
	Mélanocytes	Nombre réduit, pigmentation uniforme	Nombre augmenté, pigmentation hétérogène, présence de taches
	Cellules de Langerhans	Nombre réduit	Nombre réduit
Derme	Fibroblastes	Nombre réduit, synthèse réduite	Forte activité de biosynthèse
	Matrice extracellulaire	Réduction fibres de collagène	Dégradation des fibres de collagène, distribution éparse
	GAG	Réduction fibres oxytalanés Diminution du contenu en GAG	Accumulation de matériel élastotique Augmentation HA, accumulation au niveau du matériel élastotique
	Cellules	Diminution mastocytes	Augmentation mastocytes et neutrophiles
Annexes	Glandes sudoripares	Diminution production de sueur	Diminution production de sueur
	Glandes sébacées	Diminution production de sébum	Diminution production de sébum
	Poils et cheveux	Perte des poils et des cheveux	Perte des poils et des cheveux

1.3.1.1. Modifications hormonales

Les hormones et en particulier les hormones sexuelles telles que les œstrogènes et la testostérone diminuent avec l'âge (Chahal & Drake, 2007). Les œstrogènes ont un rôle dans la physiologie cutanée et sont impliqués dans la synthèse du collagène et de l'acide hyaluronique (pour revue : Verdier-Sévrain *et al.*, 2006). Leur diminution résulte en un amincissement de l'épiderme, une perte de l'hydratation et du contenu en collagène, ainsi qu'en une moindre capacité à cicatriser. Ces effets sont observés chez la femme, pour qui le vieillissement chronologique s'accélère à la ménopause suite au déficit en œstrogènes, mais aussi chez l'homme.

1.3.1.2. Raccourcissement des télomères

Les télomères sont des répétitions de séquences TTAGGG qui forment une coiffe protégeant la portion terminale des chromosomes, prévenant ainsi leur fusion. À chaque division cellulaire, ces télomères se raccourcissent, jusqu'à un stade critique, après environ 50 divisions (limite de Hayflick), où les cellules cessent de se diviser et entrent en sénescence. Le raccourcissement des télomères est ainsi associé au vieillissement de l'organisme en général

(pour revue : Aubert & Lansdorp, 2008). La télomérase est une enzyme de réparation qui permet de compenser le raccourcissement des télomères via la synthèse de nouvelles séquences TTAGGG. Elle est exprimée uniquement dans les tissus qui subissent une forte régénération, comme le tractus gastro-intestinal et le système hématopoïétique. Dans la peau, la télomérase est retrouvée dans l'épiderme, qui est en perpétuel renouvellement, mais pas dans le derme où les fibroblastes prolifèrent peu (Härle-Bachor & Boukamp, 1996). Des mutations dans les gènes codant pour la télomérase sont à l'origine de plusieurs maladies génétiques humaines, dont la dyskératose congénitale (pour revue : Kirwan & Dokal, 2008). Les patients atteints de cette pathologie présentent notamment des anomalies au niveau cutané, telles qu'une pigmentation anormale, la perte précoce des cheveux et l'apparition de cheveux blancs. Ainsi, cette pathologie suggère que le maintien de la longueur des télomères est important pour l'homéostasie cutanée.

1.3.1.3. Stress oxydatif

L'oxygène, bien qu'élément indispensable à notre survie, est également à l'origine d'espèces réactives pouvant être néfastes pour l'organisme. En effet, le dioxygène O_2 peut subir des étapes successives de réduction, aboutissant à la formation de ROS (pour revue : Barouki, 2006). Dans un premier temps, au contact d'enzymes ou de métaux, il peut capter un électron et former le radical superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Ce radical libre peut ensuite être transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) sous l'action d'enzymes détoxifiantes, les super oxyde dismutases. Le peroxyde d'hydrogène est quant à lui à l'origine du radical hydroxyle ($\cdot OH$), extrêmement réactif.

Les ROS sont générées en conditions physiologiques, notamment durant la chaîne respiratoire qui permet d'apporter l'énergie à la cellule via les mitochondries. En temps normal, ces radicaux libres sont régulés par le système anti-oxydant de l'organisme constitué d'enzymes (catalase, superoxyde dismutases et glutathion peroxydase) et de molécules anti-oxydantes (glutathion, vitamines A, C et E, ...). Cependant, avec l'âge le système anti-oxydant fonctionne moins bien, la plupart de ces enzymes et molécules étant moins exprimées, notamment au niveau du derme : cela conduit au stress oxydatif (Rhie *et al.*, 2001). Les ROS induisent alors des ruptures et des mutations de l'ADN, l'inactivation des protéines et des enzymes et la peroxydation des lipides membranaires. De plus, le peroxyde d'hydrogène, même à faible dose, provoquerait l'entrée en sénescence des cellules (Chen & Ames, 1994).

L'ADN peut être endommagé par les ROS, via la rupture de ses brins, la dimérisation de certaines de ses bases (plus généralement les thymidines) ou l'oxydation des guanosines (en 8-oxo-guanosine). Cela peut conduire à des mutations, qui sont normalement réparées efficacement par le système de réparation de l'ADN ; mais qui peuvent aboutir à la transformation de la cellule en cellule cancéreuse si ce système de réparation fait défaut. L'ADN mitochondrial, du fait de sa proximité avec la chaîne respiratoire, est également une cible de ces ROS. Le nombre de mutations de l'ADN mitochondrial est par ailleurs augmenté avec l'âge (Ames *et al.*, 1995), ce qui résulte en une altération fonctionnelle des mitochondries (Sastre *et al.*, 2003).

Les protéines et les enzymes peuvent également être affectées par les ROS, qui induisent des modifications de leur structure, altérant leur stabilité et leur fonctionnalité. En conditions physiologiques, ces protéines oxydées vont être dégradées en peptides par le protéasome, un système enzymatique non lysosomal. Cependant avec l'âge, l'expression des sous-unités composant le protéasome est diminuée, d'où un déclin de son activité protéolytique conduisant à une accumulation de protéines oxydées (pour revue : Carrard *et al.*, 2002). De plus, le protéasome peut être directement inactivé par l'oxydation de ses composants via les ROS. En parallèle, certaines protéines peuvent également subir des modifications au contact de sucres provenant de notre alimentation (pour revue : Paeon, 2010). En effet, ceux-ci peuvent réagir spontanément avec les fonctions amines libres des protéines (des résidus lysine et arginine), ce qui génère des produits de la glycation. Ces produits vont subir des oxydations et devenir irréversiblement attachés entre eux : ce sont les AGE (pour *advanced-glycosylation end products*). Le protéasome n'étant pas capable de dégrader ces AGE, ces derniers s'accumulent dans la cellule. Dans la peau, les AGE sont observés au niveau des fibres élastiques et de collagènes où ils s'accumulent avec l'âge, participant ainsi au manque d'élasticité et de souplesse cutanée (Jeanmaire *et al.*, 2001).

Les lipides membranaires, notamment les acides gras insaturés, peuvent être modifiés par les ROS via le processus de peroxydation lipidique. Cette transformation des lipides altère le fonctionnement des membranes cellulaires, et peut causer leur rupture et donc aboutir à la mort de la cellule. De plus, certains produits de la lipoperoxydation, comme le 4-hydroxynonéal et le malondialdéhyde, peuvent à leur tour réagir avec les protéines et l'ADN et les endommager.

1.3.1.4. Altérations de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire du derme est le lieu de modifications structurales durant le processus de vieillissement intrinsèque (**Figure 3**).

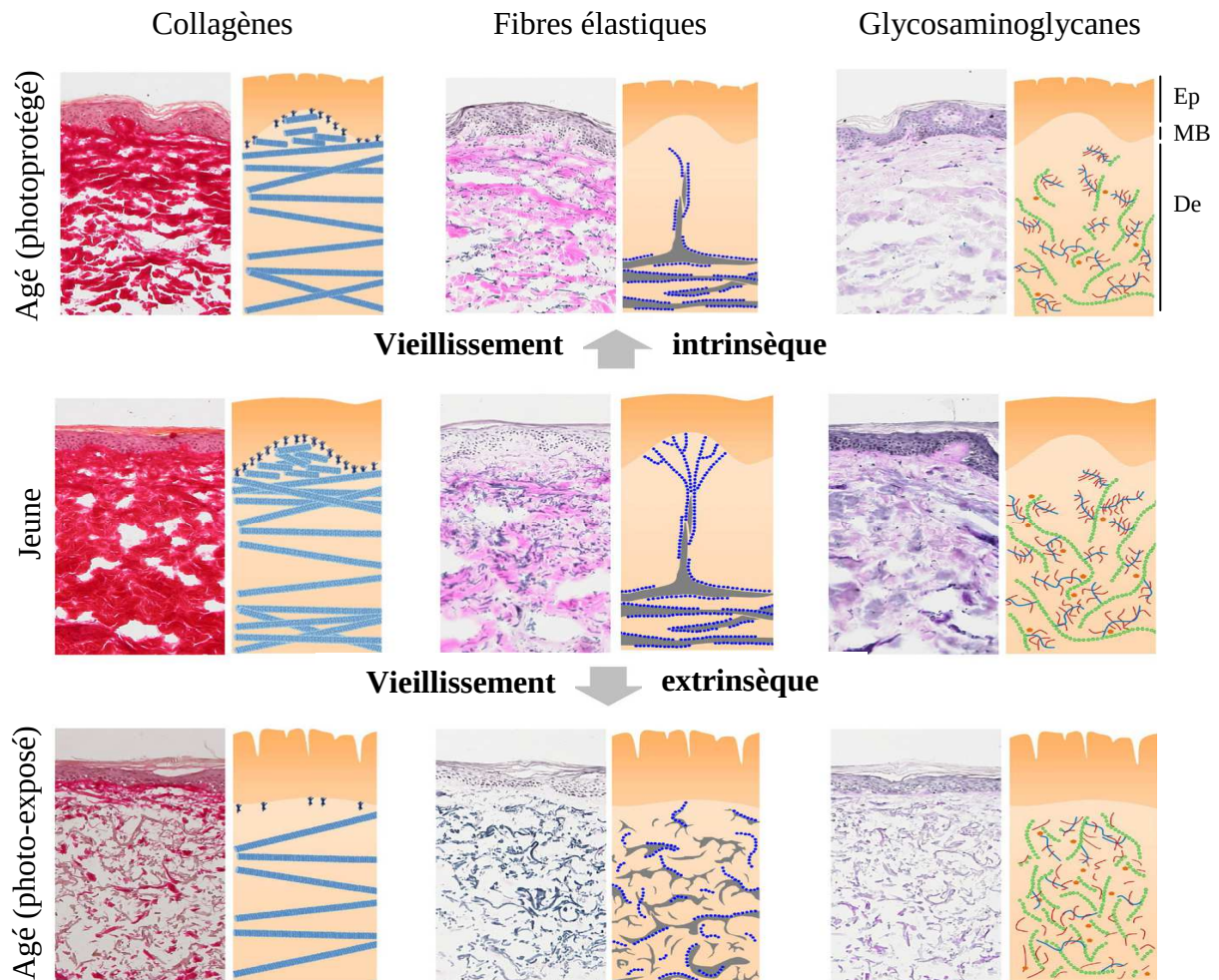


Figure 3 : Effets du vieillissement intrinsèque et photo-induit sur la morphologie de la peau et de ses constituants.

Ep, épiderme ; MB, membrane basale ; De, derme (d'après Naylor *et al.*, 2011).

Durant le vieillissement, les fibroblastes sont moins nombreux et synthétisent moins de collagène. À l'inverse, ils synthétisent plus de métalloprotéases matricielles (MMP), une famille de 23 protéases impliquées principalement dans la dégradation protéolytique des constituants de la matrice extracellulaire et de la membrane basale. En effet, le niveau d'expression des MMP-1 (collagénase), MMP-2 et MMP-9 (gélatinases) est augmenté dans des fibroblastes issus de patients âgés (Varani *et al.*, 2000). Ces enzymes peuvent alors dégrader les fibres de collagènes de type I et III (El-Domyati *et al.*, 2002). De la même façon, l'élastine et la fibrilline qui composent les fibres oxytalanes sont dégradées (Robert *et al.*,

1988), tandis que les fibres élastiques matures du derme profond ne sont pas impactées. Il en résulte la formation de rides assez fines et une perte d'élasticité progressive. Ces changements sont également à l'origine du ralentissement de la cicatrisation cutanée observée chez les personnes âgées (Uitto, 1989). Enfin, le vieillissement intrinsèque s'accompagne d'une diminution du contenu en GAG. En effet, avec l'âge la quantité d'acide hyaluronique est diminuée, plus particulièrement au niveau de l'épiderme (Ghersetich *et al.*, 1994 ; Oh *et al.*, 2011). Le niveau global de GAG sulfatés est quant à lui également réduit avec l'âge, à la fois dans l'épiderme et le derme. Cela se répercute alors sur la capacité de la peau à retenir l'eau et contribue à la sécheresse cutanée associée au vieillissement. De plus, ces variations sont généralement plus accentuées chez la femme que chez l'homme (Oh *et al.*, 2011), ce qui est certainement lié aux modifications hormonales observées au cours du vieillissement.

1.3.2. Photovieillissement

Le vieillissement extrinsèque est la résultante de nombreux facteurs environnementaux dont la pollution (fumée de cigarette, pollution atmosphérique), le mode de vie (alimentation, consommation d'alcool), et majoritairement de l'exposition solaire, dont les effets néfastes s'ajoutent aux effets du chronovieillissement (**Tableau 1**). Le photovieillissement est caractérisé par des altérations importantes au niveau du derme, touchant à la fois les fibres élastiques, les fibres de collagènes et les glycosaminoglycanes (**Figure 3**) ; ce qui conduit à la formation de rides profondément marquées et à une perte importante de l'élasticité cutanée (pour revue : Bernstein & Uitto, 1996 ; Scharffetter-Kochanek *et al.*, 2000). De plus, des taches de vieillesse, également appelées lentigo, apparaissent généralement au niveau des zones de la peau ayant été exposées au soleil. Les modifications observées au cours du photovieillissement reposent principalement sur la génération de ROS suite à une irradiation UV, qui vont engendrer une inflammation cutanée et une forte activation d'enzymes protéolytiques.

1.3.2.1. Inflammation cutanée

L'irradiation de la peau par les UV engendre une inflammation cutanée (pour revue : Pillai *et al.*, 2005). En effet, les UV peuvent stimuler directement les cellules cutanées (kératinocytes, fibroblastes, mastocytes), qui vont alors relarguer des cytokines et des médiateurs pro-inflammatoires, tels que l'IL-1 (pour *interleukine-1*), le TNF- α , la prostaglandine ou encore l'histamine, à l'origine d'une réponse inflammatoire (Takashima & Bergstresser, 1996). Cela

va notamment conduire à une infiltration de neutrophiles et de monocytes dans l'épiderme et le derme. Les neutrophiles sécrètent des enzymes protéolytiques, notamment l'élastase (protéase à sérine) (Weissmann *et al.*, 1978). De plus, ces cellules phagocytaires génèrent des ROS comme mécanisme de défense (Trenam *et al.*, 1992). L'irradiation UV et la pollution peuvent également conduire directement à la production de ROS, ainsi qu'à l'inactivation du système anti-oxydant (Kohen & Gati, 2000). L'exposition solaire et l'inflammation qui en découle sont à l'origine d'un stress oxydatif plus important que celui qui a lieu durant le chronovieillessement. Les effets déjà décrits précédemment (endommagement de l'ADN, oxydation des protéines et des lipides) sont alors exacerbés durant le photovieillessement. En outre, les ROS générés sont responsables de l'activation de facteurs de transcription, tels que NFkB (pour *nuclear factor kappa B*) et AP-1 (pour *activator protein-1*), qui vont moduler l'expression de certains gènes. C'est notamment le cas de plusieurs MMP, qui sont alors sur-exprimées, et du collagène de type I dont la synthèse est réduite (Rittié & Fisher, 2002). En outre, le stress oxydatif généré par l'irradiation UV peut conduire à la rupture des lysosomes qui vont déverser leur contenu, et notamment les cathepsines à cystéine, dans le cytoplasme (Brunk *et al.*, 2001). La cathepsine L est par ailleurs capable d'induire l'apoptose via l'activation de caspases (Ishisaka *et al.*, 1998). Cependant, l'hurpine, un inhibiteur de la cathepsine L présent dans la peau (voir Chapitre 3.2.6.3), protégerait les kératinocytes de l'apoptose induite par les UV, certainement en inhibant la cathepsine L déversée dans le cytosol (Welss *et al.*, 2003). Les cathepsines à cystéine font l'objet d'un chapitre détaillé (voir Chapitre 3).

1.3.2.2. Dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire

L'irradiation UV entraîne la sur-expression de certaines MMP, notamment via les ROS. Les UVA comme les UVB sont capables d'induire ces protéases, à la fois *in vitro* et *in vivo*. En effet, les UVB stimulent l'expression des MMP-1, -3 et -9 par les kératinocytes au niveau de l'épiderme (Fisher *et al.*, 1996), et les UVA celle des MMP-1, -2 et -3 par les fibroblastes du derme (Scharffetter *et al.*, 1991 ; Herrmann *et al.*, 1993). La MMP-1 initie le clivage des collagènes fibrillaires de type I et III du derme, qui peuvent ensuite être dégradés par les MMP-2, MMP-3 et MMP-9 (pour revue : Quan *et al.*, 2009). La MMP-2 est également capable de dégrader l'élastine. De plus, des protéases à sérine comme l'élastase, provenant de l'infiltration de neutrophiles et des fibroblastes, sont également sécrétées sous l'influence des UV et des ROS (Labat-Robert *et al.*, 2000). Par ailleurs, il est à noter que ces deux classes de protéases sont capables de s'activer les unes les autres, et de dégrader leurs inhibiteurs

endogènes (Mallya *et al.*, 1994). En parallèle, le niveau d'expression des inhibiteurs spécifiques des MMP, les TIMP (pour *tissue inhibitors of matrix metalloproteinases*), diminue avec l'âge (Hornebeck, 2003). Tous ces événements conduisent à un déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases en faveur d'une dégradation tissulaire excessive. Bien que certaines cathepsines à cystéine (cathepsines K et S) possèdent dans leur promoteur des sites de fixation au facteur de transcription AP-1 (Gelb *et al.*, 1997 ; Shi *et al.*, 1992), et pourraient donc potentiellement être sur-exprimées sous l'action des UV et des ROS, leur statut dans le vieillissement cutané est peu documenté. Néanmoins, deux études récentes montrent une diminution de l'expression des cathepsines B et K dans l'épiderme et le derme avec le photovieillissement (voir Chapitre 3.4.2.5) (Lai *et al.*, 2010 ; Zheng *et al.*, 2011).

Le signe clinique majeur du photovieillissement est l'élastose solaire, phénomène qui n'est pas retrouvé dans le chronovieillissement. Elle résulte d'une accumulation de matériel élastotique dans le derme, composé d'élastine anormale, de fibronectine et de fibrilline. Cette accumulation est causée par une sur-expression de l'élastine et de la fibrilline par les fibroblastes (Bernstein *et al.*, 1994). En parallèle, les fibres élastiques existantes sont désorganisées et dégradées ; cette dégradation excessive étant due à l'activité d'élastases et de MMP. Concernant les cathepsines à cystéine, une étude montre que l'irradiation UV de fibroblastes humains et d'explants cutanés induirait l'expression de la cathepsine K, qui en conditions physiologiques est peu exprimée par ces cellules (Codriansky *et al.*, 2009). Les auteurs suggèrent que cette enzyme jouerait un rôle dans le phénomène d'élastose observé durant le photovieillissement, en dégradant l'élastine au niveau intracellulaire. L'altération structurale et donc fonctionnelle du réseau élastique conduit à la formation de rides profondément marquées ainsi qu'à une perte importante de l'élasticité. Il a également été montré une désorganisation importante des fibres élastiques, comparable à celle observée dans le phénomène d'élastose solaire, dans des peaux photoprotégées de fumeurs (Just *et al.*, 2007). Ces résultats corroborent les études montrant une corrélation entre cigarette et développement prématuré de rides faciales (Kadunce *et al.*, 1991 ; Koh *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'inhibition de l'élastase de fibroblastes par un inhibiteur spécifique préviendrait la formation de rides UVB-induites dans un modèle de rat, via une diminution de la dégénération du réseau élastique (Tsukahara *et al.*, 2001).

Une autre caractéristique du photovieillissement est la dégradation des fibres de collagènes, notamment par les MMP. Cette dégradation est incomplète, et conduit à l'accumulation de fragments de collagène dans le derme, ce qui réduit l'intégrité structurale de la peau (Fisher *et al.*, 1997). De plus, ces produits de dégradation inhibent la néosynthèse de collagène,

accentuant la dégénération du réseau de collagène (Varani *et al.*, 2001). Une des explications possibles à cette inhibition serait que les fibroblastes nécessitent un réseau de collagène intègre afin d'observer leur morphologie typique de cellules étirées, condition dont dépend leur fonctionnement optimal (Nakagawa *et al.*, 1989).

Enfin, les GAG, et plus particulièrement l'acide hyaluronique et les chondroïtines sulfates, sont augmentés dans les peaux photo-exposées au niveau du derme (Bernstein *et al.*, 1996 ; Oh *et al.*, 2011). Cela peut paraître paradoxal sachant que le vieillissement de la peau s'accompagne d'une sécheresse cutanée et que les GAG sont en partie responsables de l'hydratation de la peau. Cependant des études réalisées par microscopie confocale révèlent qu'en réalité ces GAG sont distribués anormalement, formant des amas au niveau du matériel élastotique, au lieu d'être dispersés dans tout le derme (Bernstein *et al.*, 1996). Bien qu'ils soient plus nombreux, cette localisation aberrante interfère avec la capacité des GAG à retenir les molécules d'eau, contribuant ainsi à la perte d'hydratation.

1.3.2.3. Lentigo sénile

Le lentigo sénile, également appelé « tache de vieillesse », est une autre composante typique du photovieillissement. Ces taches sont couramment retrouvées au niveau des zones ayant été exposées au soleil (visage, décolleté, dos des mains) et apparaissent vers l'âge de 50 ans. Ce sont des taches brunes, lisses, allant de moins d'un millimètre jusqu'à quelques centimètres de diamètre. Cependant, plusieurs taches peuvent se rejoindre et en former de plus grosses. Ces taches de vieillesse diffèrent des taches de rousseur car elles persistent après l'exposition solaire, contrairement aux taches de rousseur, qui, elles, s'estompent. D'un point de vue histologique, il a été montré au niveau de ces taches l'élongation des crêtes épidermiques et la présence d'un nombre plus important de mélanocytes au niveau de la couche basale de l'épiderme (Cario-André *et al.*, 2004). Ces mélanocytes sont riches en mitochondries, traduisant une activité de synthèse protéique plus importante (Noblesse *et al.*, 2006). De plus, de nombreux mélanosomes sont localisés dans les kératinocytes de la couche basale. Les irradiations, notamment par les UVB, entraînent la libération de cytokines par les kératinocytes, qui vont stimuler la production de mélanine, conduisant à l'hyperpigmentation observée dans le lentigo sénile (Kadono *et al.*, 2001).

1.3.3. Stratégies de lutte anti-âge

Avec l'augmentation de l'espérance de vie dans les pays développés, l'impact du vieillissement sur l'apparence et la fonctionnalité de la peau a fait de plus en plus l'objet d'études. Une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie du vieillissement cutané a permis le développement de nouvelles stratégies capables de ralentir ou de réparer ses effets indésirables (pour revue : McCullough & Kelly, 2006 ; Robinson & Aasi, 2011).

Le rayonnement solaire étant à l'origine du vieillissement cutané, mais également de la photocarcinogenèse, s'en protéger est essentiel. La photoprotection passe par les vêtements, lunettes et chapeaux, qui selon la texture, la couleur et l'épaisseur vont pouvoir réfléchir le rayonnement solaire, et bien sûr par l'utilisation d'une crème solaire adaptée. Des études cliniques ont par ailleurs montré que l'utilisation correcte et régulière de ces crèmes, en plus de protéger des coups de soleil, prévient certains aspects du vieillissement comme les rides ou les altérations de la pigmentation (Boyd *et al.*, 1995 ; Seité *et al.*, 2000).

Les altérations observées au cours du vieillissement cutané découlent en grande partie du stress oxydatif et de la génération de ROS. L'incorporation d'anti-oxydants dans des crèmes solaires et dermocosmétiques afin d'améliorer notre système de défense contre ces radicaux libres est donc une piste privilégiée. En effet, l'acide ascorbique (dérivé de vitamine C) et l' α -tocophérol (dérivé de la vitamine E) sont couramment utilisés ; et lorsque combinés ensemble, ces molécules agissent de façon synergique et protègent des dommages de l'ADN en empêchant la formation des dimères de thymidines (Lin *et al.*, 2003 ; Murray *et al.*, 2008). De plus, des études cliniques ont montré que l'application de crèmes à base de vitamine C améliore l'aspect global de la peau et réduit les rides marquées, via l'activation de la synthèse de collagène et des fibres élastiques (Fitzpatrick & Rostan, 2002 ; Humbert *et al.*, 2003). Les polyphénols, anti-oxydants naturellement présents dans le raisin et le vin, les thés vert et noir, les fruits et les légumes, sont également de bons candidats (pour revue : Svobodová *et al.*, 2003). Ces molécules ont démontré un effet photoprotecteur, notamment en inhibant les facteurs de transcription AP-1 et NF κ B à l'origine de la sur-expression des MMP (Adhami *et al.*, 2003 ; Balasubramanian & Eckert, 2007). Les rétinoïdes, dérivés de la vitamine A, permettent la réduction des rides par la stimulation de la synthèse des collagènes et des GAG et la reformation des fibres oxytalanes (Weiss *et al.*, 1988 ; Weinstein *et al.*, 1991 ; Kafi *et al.*, 2007). De plus, ils améliorent le renouvellement de l'épiderme, conduisant à une peau moins fragile, et permettent de réduire la synthèse de mélanine, améliorant

l'hyperpigmentation et les taches de vieillesse (Rafal *et al.*, 1992). Comme les polyphénols, les rétinoïdes préviennent la dégénération du tissu conjonctif en empêchant la sur-expression des MMP via l'inhibition du facteur de transcription AP-1 (Fisher *et al.*, 1999). Une partie des stratégies anti-âge employées repose donc sur la régulation de l'expression et de l'activité de protéases, afin d'empêcher la dégradation excessive des protéines de la matrice extracellulaire et de la membrane basale.

2. La membrane basale

2.1. Structure et fonctions

La membrane basale est une forme spécialisée de la matrice extracellulaire, épaisse de 50 à 100 nm, qui est présente dans chaque tissu de l'organisme (pour revue : LeBleu *et al.*, 2007 ; Van Agtmael & Bruckner-Tuderman, 2010). Cette structure particulière permet d'établir la liaison entre les cellules (épithéliales ou endothéliales) et le tissu conjonctif sous-jacent, et d'apporter ainsi un support structural aux cellules, par accrochage des épithéliums via les hémidesmosomes. Outre ce rôle strictement structural, la membrane basale possède également de nombreuses autres fonctions comme la régulation du comportement cellulaire (migration, prolifération, différenciation) (Timpl, 1989). Elle joue aussi le rôle de barrière cellulaire sélective permettant de contrôler les échanges de cellules et de macromolécules entre les deux compartiments, et de réservoir pouvant libérer de façon régulée des facteurs de croissance et des cytokines notamment durant les phénomènes de remodelage et de réparation (Iozzo, 2005).

L'utilisation de modèles de tumeurs tels que le sarcome murin EHS (pour Engelbreth-Holm et Swarm, les auteurs qui l'ont découvert), a permis dans les années 1980 une meilleure compréhension de la composition et du fonctionnement des membranes basales. En effet, cette tumeur produit de grandes quantités de membrane basale, dont les composants peuvent être facilement isolés (Orkin *et al.*, 1977). Cette membrane basale, commercialisée sous le nom de Matrigel™ (BD Biosciences) ou encore ECM gel (Sigma-Aldrich), est par ailleurs couramment utilisée comme modèle dans des études d'invasion cellulaire. Bien que formée des mêmes constituants majoritaires (laminine, collagène IV, nidogène et perlécan), la composition et l'assemblage de la membrane basale est propre à chaque tissu, ce qui va lui conférer sa spécificité. La diversité des membranes basales est principalement due à la proportion en chacun des différents constituants et à la présence de nombreuses isoformes : 16 laminines, 6 collagènes IV, 2 nidogènes (Yurchenco & Schittny, 1990 ; Aumailley *et al.*, 2005). L'hétérogénéité des membranes basales résulte également de régulations transcriptionnelles (épissage alternatif, régulation de gènes par des facteurs de transcription) et de modifications post-traductionnelles (maturation protéolytique de certaines laminines, différents types et longueurs des chaînes de GAG du perlécan).

La microscopie électronique à transmission a permis de montrer que la membrane basale est formée de trois couches (**Figure 4**) : *lamina lucida*, *densa* et *reticularis* (McMillan *et al.*, 2003).

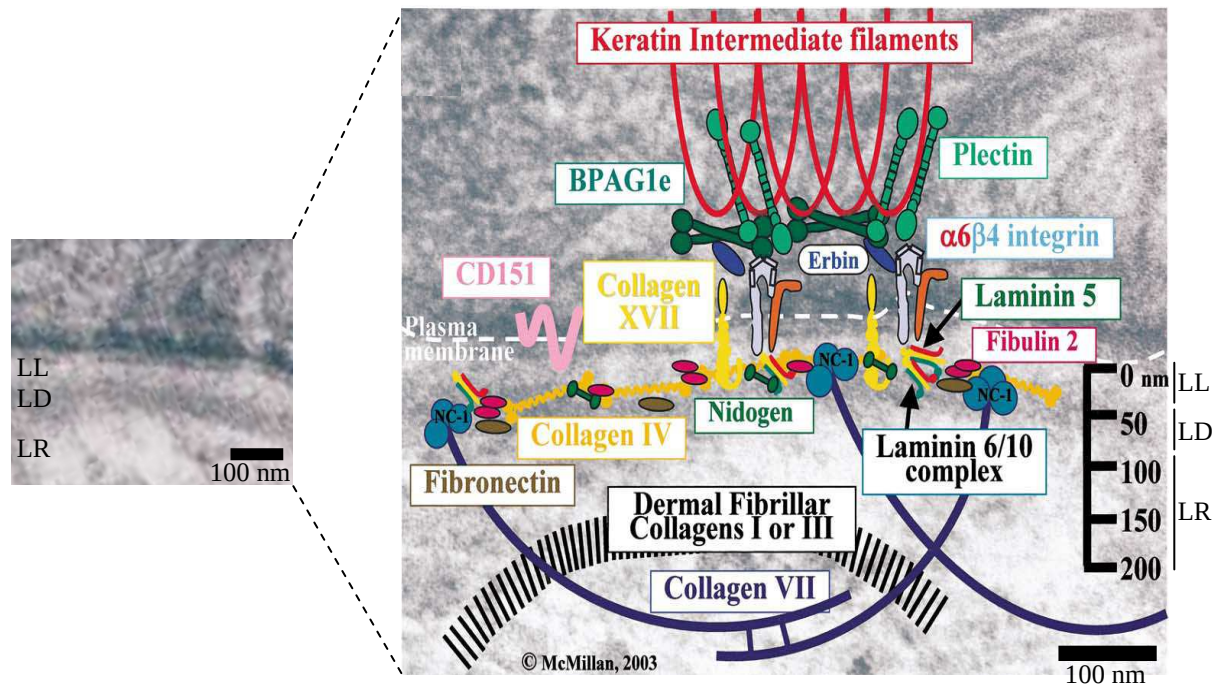


Figure 4 : Représentation de l'ultrastructure de la jonction dermo-épidermique.

LL : *lamina lucida*, LD : *lamina densa* et LR : *lamina reticularis* (d'après McMillan *et al.*, 2003).

Au niveau de la peau, la *lamina lucida* (d'environ 40 nm), nommée ainsi car elle apparaît claire en microscopie, est directement en contact avec la membrane plasmique des kératinocytes et mélanocytes de la couche basale. En effet, l'épiderme, via les filaments de kératines, s'attache aux intégrines $\alpha 6 \beta 4$ qui constituent les hémidesmosomes. Au niveau de la *lamina lucida*, ces intégrines se lient à la laminine-332, anciennement laminine-5 (**Tableau 2**) (Aumailley *et al.*, 2005) et au collagène XVII, qui forment les filaments d'ancrage et permettent de lier l'épiderme à la *lamina densa* (Masunaga *et al.*, 1997). La *lamina densa* (d'environ 50 nm), appelée ainsi à cause de son aspect dense, est principalement composée des réseaux de collagènes IV et de laminines, reliés ensemble via les nidogènes et le perlécane. Enfin, la membrane basale est connectée au derme via les fibres d'ancrage, qui composent la *lamina reticularis*, également appelée *sub lamina densa*. Ces structures semi-circulaires, formées principalement de dimères de collagène de type VII (Sakai *et al.*, 1986), s'étendent sur environ 300 nm jusqu'au niveau du derme papillaire, où elles peuvent s'associer aux collagènes fibreux de type I et III (Villone *et al.*, 2008). Elles se réinsèrent ensuite au niveau

de la *lamina densa*, où le collagène VII se lie à la laminine-332 et au collagène IV (Burgeson, 1993 ; Rousselle *et al.*, 1997). Il a été proposé que cette division conventionnelle de la membrane basale en trois couches soit due à un artefact lors de la préparation du tissu (pour revue : Hashmi & Marinkovich, 2011). La déshydratation que subit l'échantillon entraînerait une séparation spatiale entre la couche basale de l'épiderme et la *lamina densa* ; la *lamina lucida* pourrait alors ne pas avoir de réalité biologique.

La question de l'origine de la membrane basale cutanée s'est longtemps posée, certains déclarant qu'elle est exclusivement synthétisée par le tissu conjonctif sous-jacent (Gersh & Catchpole, 1949), d'autres affirmant qu'elle est d'origine épidermique (Briggaman *et al.*, 1971). La réalité est plus complexe, puisque la formation de la JDE résulte d'une interaction dynamique entre les kératinocytes et les fibroblastes (Marinkovich *et al.*, 1993 ; Smola *et al.*, 1998 ; El Ghalbzouri *et al.*, 2005). Ces études d'interaction entre les deux compartiments ont pu être réalisées grâce à l'apparition de nouvelles techniques de culture cellulaire, appelées cultures organotypiques, qui consistent à cultiver des kératinocytes sur une matrice collagénique contenant des fibroblastes. Les kératinocytes peuvent alors proliférer et former un épithélium stratifié, ce qui permet d'obtenir un meilleur modèle d'étude de la peau et de sa membrane basale. Ainsi, une étude utilisant cette méthode montre que le nidogène est synthétisé principalement par les fibroblastes, mais que la présence de kératinocytes est nécessaire pour sa disparition du milieu interstitiel et sa relocalisation au niveau de la membrane basale (Fleischmajer *et al.*, 1995). Cela suggère que les kératinocytes régulent négativement la synthèse de nidogène ou induisent sa dégradation protéolytique. Les interactions kératinocytes-fibroblastes sont médiées par des facteurs solubles sécrétés qui peuvent traverser la membrane basale (Kondo *et al.*, 1997). En effet, plusieurs cytokines et facteurs de croissance, comme l'EGF (pour *epidermal growth factor*), le TNF- α ou encore le TGF- β (pour *transforming growth factor- β*), sont capables de réguler l'expression des collagènes, nidogènes et laminines (König & Bruckner-Tuderman, 1992 ; Neubauer *et al.*, 1999). De plus, la présence des deux types cellulaires est cruciale pour la localisation optimale des constituants de la membrane basale (Marionnet *et al.*, 2006). En effet, les kératinocytes sont requis pour la bonne localisation au niveau de la JDE des constituants synthétisés par les fibroblastes (nidogène), tandis que les fibroblastes sont nécessaires pour le bon dépôt des constituants d'origine épidermique (laminine-332, collagène de type VII).

2.2. Constituants de la membrane basale

2.2.1. Le collagène IV

Environ 50 protéines composent la membrane basale, mais le collagène IV est la protéine la plus abondante, puisqu'il constitue 50 % de toutes les membranes basales. Contrairement aux collagènes de type I à III, c'est un collagène non fibrillaire, d'environ 400 kDa (Kefalides, 1973). Les collagènes non fibrillaires diffèrent des autres collagènes par la présence de domaines globulaires non-collagéniques (domaines NC). Le collagène IV est synthétisé par les cellules (fibroblastes et kératinocytes) sous forme de protomères, qui sont des hétérotrimères formés par trois chaînes polypeptidiques α . Chez les mammifères, six gènes distincts codent pour six chaînes de collagène IV ($\alpha 1$ - $\alpha 6$), mais bien qu'un nombre important de combinaisons soit possible, seules trois combinaisons ont été réellement identifiées chez l'homme : $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ (IV), $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ (IV) et $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ (IV) (pour revue : Khoshnoodi *et al.*, 2008). Durant le développement embryonnaire, c'est le réseau d'hétérotrimères $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ (IV) qui prédomine dans toutes les membranes basales, puis ce réseau est partiellement remplacé par les deux autres combinaisons, de façon tissu-spécifique ; $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ (IV) étant retrouvée au niveau de la peau (Ghohestani *et al.*, 2001). Chaque chaîne est composée d'un domaine N-terminal 7S, d'un domaine en triple hélice (domaine collagénique) et d'un domaine C-terminal NC1 (**Figure 5A**). La formation des hétérotrimères de collagène IV est médiée par l'association des trois domaines NC1, ce qui induit l'enroulement des chaînes en une triple hélice (Khoshnoodi *et al.*, 2006). Le domaine collagénique consiste en des répétitions du motif Gly-X-Y, où le plus souvent X est une proline et Y une hydroxyproline. Ces répétitions sont interrompues à de nombreux endroits, conférant ainsi sa flexibilité au collagène IV (Hofmann *et al.*, 1984). Les domaines 7S et NC1 sont essentiels à la formation des réseaux de collagène IV, puisque ce sont eux qui permettent la formation d'oligomères (Timpl *et al.*, 1981). La formation de larges structures de soutien est certainement l'une des fonctions majeures du collagène IV. Cependant, le collagène IV a également la capacité de se lier aux cellules, via des interactions avec des intégrines de type $\beta 1$, principalement les intégrines $\alpha 1\beta 1$ et $\alpha 2\beta 1$ (Aumailley & Gayraud, 1998) ; qui sont régies par de multiples sites localisés à la fois au niveau de la triple hélice et des domaines NC1 (Khoshnoodi *et al.*, 2008). Des mutations dans le gène codant pour la chaîne $\alpha 1$ (IV) chez la souris entraînent des anomalies vasculaires, conduisant à une porencéphalie (présence de cavités dans les hémisphères

cérébraux) et à une hémorragie cérébrale (Gould *et al.*, 2005). Ces mutations résultent en des membranes basales défectueuses affectant les reins (glomérulopathie) et les yeux (Van Agtmael *et al.*, 2005). Des pathologies humaines touchant les reins, comme le syndrome d'Alport (voir Chapitre 2.4 pour plus de détails), ont également été associées avec des mutations dans les chaînes $\alpha 3$, $\alpha 4$ et $\alpha 5(IV)$ (pour revue : Abreu-Velez & Howard, 2012).

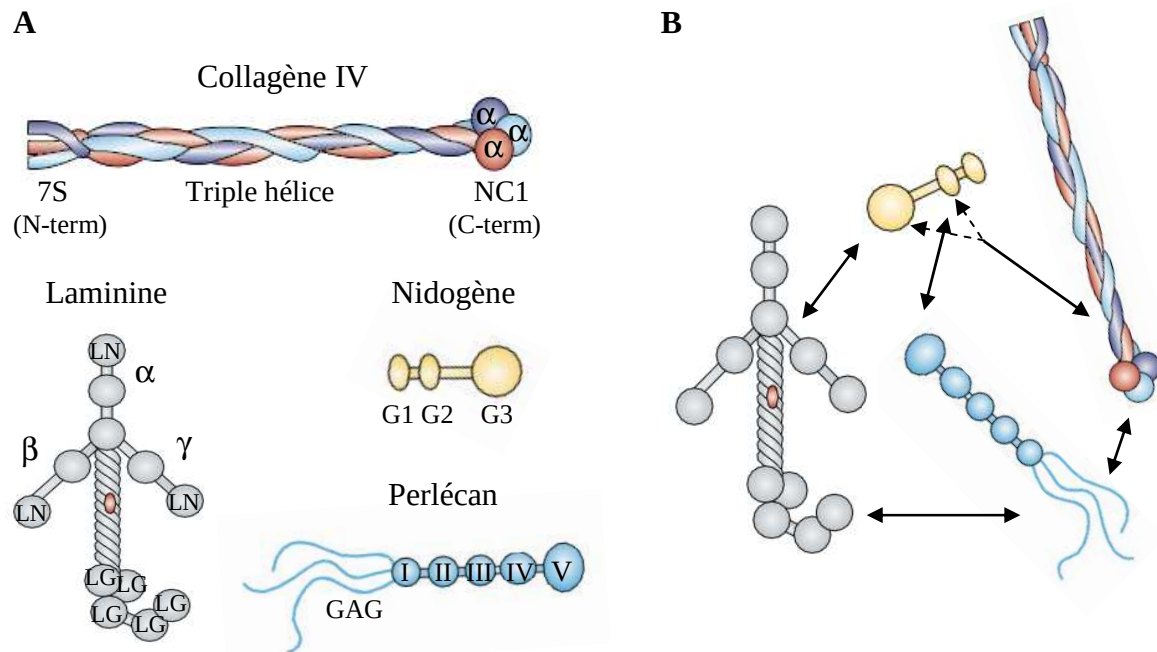


Figure 5 : Structure des constituants majoritaires de la membrane basale.

A) Représentation schématique des principaux constituants de la membrane basale.

B) Sites d'interaction entre les différents constituants (d'après Kalluri, 2003a).

2.2.2. Les laminines

La laminine est la protéine non-collagénique la plus abondante des membranes basales (Timpl *et al.*, 1979a). Elle est composée de trois chaînes polypeptidiques α (400 kDa), β (200 kDa) et γ (200 kDa) liées ensemble par des ponts disulfures, qui forment une structure cruciforme (**Figure 5A**) (Engel *et al.*, 1981). Les trois bras courts de la croix sont formés des parties N-terminales de chacune des chaînes α , β et γ , dont les extrémités sont constituées des domaines LN (pour *laminin N-terminal domain*) impliqués dans la polymérisation des laminines (McKee *et al.*, 2007). Les trois chaînes se réunissent ensuite pour former le bras long de la croix, et en C-terminal se trouvent cinq domaines globulaires spécifiques de la chaîne α , les domaines LG (pour *laminin globular domain*). Ces domaines sont les sites principaux d'interaction des laminines avec des récepteurs situés à la surface des cellules comme les intégrines ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 6\beta 4$, $\alpha 7\beta 1$ et $\alpha 9\beta 1$), le syndécan et l' α -dystroglycan

(Timpl *et al.*, 2000). La formation de l'hétérotrimère de laminine passe par la création d'un dimère stable constitué des chaînes β et γ , qui va ensuite s'associer à la chaîne α , induisant ainsi la sécrétion de l'hétérotrimère (Yurchenco *et al.*, 1997). Onze gènes codent pour les différentes chaînes de laminine (α 1-5, β 1-3, γ 1-3), qui peuvent s'assembler en 16 combinaisons possibles (pour revue : Durbeej, 2010). Ces 16 isoformes de laminine ont été détectées dans les membranes basales, mais la laminine-111 (α 1, β 1, γ 1) (**Tableau 2**) est la plus abondante. Les autres isoformes sont exprimées de façon tissu-spécifique, comme c'est le cas des laminines-332, -311, et -511 qui sont retrouvées au niveau de la peau (Aumailley & Rousselle, 1999 ; Sugawara *et al.*, 2008).

Tableau 2 : Nomenclature actuelle des différentes isoformes de laminine.
(d'après Aumailley *et al.*, 2005)

Ancienne	Actuelle	Ancienne	Actuelle
1	111	8	411
2	211	9	421
3	121	10	511
4	221	11	521
5, ou 5A	332, ou 3A32	12	213
5B	3B32	14	423
6, ou 6A	311, ou 3A11	-	522
7, ou 7A	321, ou 3A21	15	523

La laminine est la première protéine de la membrane basale exprimée durant le développement embryonnaire (Dziadek & Timpl, 1985). Elle peut se lier à l'héparine ainsi qu'à l'héparane sulfate (Sakashita *et al.*, 1980), et donc aux héparane sulfate protéoglycanes (HSPG) tels que le perlécan (**Figure 5B**) (Battaglia *et al.*, 1992). Ses sites de liaisons à l'héparine sont multiples, dont l'un est retrouvé au niveau des domaines LG (Ott *et al.*, 1982 ; Skubitz *et al.*, 1988). La laminine peut également se lier aux cellules via les intégrines α 1 β 1, α 2 β 1, α 3 β 1, α 6 β 1, α 6 β 4, α 7 β 1 et α 9 β 1 (Terranova *et al.*, 1980 ; Aumailley & Smyth, 1998), ce qui lui permet d'attacher les cellules à la membrane basale, mais également de contrôler des activités cellulaires comme la migration, la prolifération, ou l'apoptose (Gonzales *et al.*, 1999 ; Mooney *et al.*, 1999). Ainsi la laminine possède un rôle structural mais également fonctionnel au sein des membranes basales. L'ablation génique de la chaîne γ 1 de la laminine chez la souris, et donc par conséquent la délétion de 10 des 16 isoformes de laminines, est létal dès le début du développement post-implantation (Smyth *et al.*, 1999). Ces embryons ne

sont pas capables de former de membranes basales, bien que les autres constituants soient présents. Des résultats similaires sont retrouvés chez des souris déficientes en chaîne $\beta 1$ (Miner *et al.*, 2004). Les embryons déficients en chaîne $\alpha 1$, quant à eux, réussissent à former une membrane basale, probablement parce que la laminine-511 compense en partie l'absence de la laminine-111 (Miner *et al.*, 2004). Cependant, ces embryons finissent par mourir car la membrane de Reichert, membrane basale embryonnaire séparant le trophoblaste des cellules de l'endoderme, n'a pas pu être formée.

2.2.3. Les nidogènes

L'entactine (Carlin *et al.*, 1981) et le nidogène (Timpl *et al.*, 1983), glycoprotéines ubiquitaires de la membrane basale découvertes par deux équipes différentes, sont les mêmes protéines. Le nidogène, dont la structure est en forme d'haltère (Paulsson *et al.*, 1986), consiste en une seule chaîne polypeptidique de 150 kDa qui forme trois domaines globulaires : G1 (30-35 kDa), G2 (31 kDa) et G3 (44 kDa) (Fox *et al.*, 1991). Ces domaines sont séparés par deux segments connecteurs : un segment court reliant G1 à G2, très sensible à la protéolyse (Mann *et al.*, 1988), et un segment plus long entre G2 et G3 (**Figure 5A**). Bien que comptant seulement pour 2 à 3 % des protéines de la membrane basale, le nidogène est néanmoins une protéine essentielle à sa stabilité puisqu'il permet de connecter les réseaux de collagènes IV et de laminines, ces molécules n'étant pas capables de s'associer directement (Aumailley *et al.*, 1989). En effet, le nidogène interagit (**Figure 5B**) via son domaine G3 avec la laminine (Paulsson *et al.*, 1987), via ses domaines G2 et G3 avec la triple hélice de collagène IV (Aumailley *et al.*, 1989), et via son domaine G2 avec le domaine V du perlécan (Aumailley *et al.*, 1993). L'interaction entre le nidogène et la laminine est forte ($K_d = 0,5$ nM) (Fox *et al.*, 1991), et particulièrement importante pour les membranes basales. En effet, lorsque ce complexe est inhibé par compétition avec un fragment de laminine (Tunggal *et al.*, 2003 ; Breitzkreutz *et al.*, 2004) ou par ablation génique du site d'interaction avec le nidogène sur la laminine (Willem *et al.*, 2002), la membrane basale est altérée, notamment au niveau du développement de certains organes comme les poumons et les reins. Le site d'interaction étant situé sur la chaîne $\gamma 1$ de la laminine, le nidogène ne peut pas se lier directement aux isoformes qui ne possèdent pas cette chaîne, comme la laminine-332. Néanmoins, l'incorporation de ces isoformes peut se faire de façon indirecte, par liaison à une autre isoforme contenant la chaîne $\gamma 1$, telle que la laminine-311 (Aumailley & Rousselle, 1999). Le nidogène peut également se lier à d'autres protéines de la membrane basale telles que la fibronectine (via son domaine

G2) et les fibulines-1 et -2 (via ses domaines G2 et G3) (Dziadek *et al.*, 1985 ; Sasaki *et al.*, 1995). De plus, le nidogène permet l'adhésion de cellules épithéliales en interagissant avec les intégrines $\alpha 3\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$ via son domaine G2 et un motif RGD (Arg-Gly-Asp) situé dans le segment connectant G2 à G3 (Chakravarti *et al.*, 1990 ; Dedhar *et al.*, 1992 ; Dong *et al.*, 1995).

Le nidogène existe sous deux formes protéiques (nidogène-1 et -2), codées par deux gènes distincts. Bien que très similaires, le nidogène-2 possède un profil d'expression plus restreint et plus spécifique des membranes basales vasculaires et musculaires, et a une taille plus importante (200 kDa) que le nidogène-1 (Kohfeldt *et al.*, 1998 ; Kimura *et al.*, 1998). De plus, l'affinité du nidogène-2 pour la laminine est considérablement plus faible que celle du nidogène-1 (environ 100 fois moins), et il n'est pas capable d'interagir avec les fibulines-1 et -2 (Kohfeldt *et al.*, 1998). Les deux isoformes ont toutefois le même profil d'interaction pour le collagène IV et le perlécan. Des souris déficientes en nidogène-1 (Murshed *et al.*, 2000 ; Miosge *et al.*, 2002) ou en nidogène-2 (Schymeinsky *et al.*, 2002) présentent une membrane basale normale, ce qui suggère une compensation de leurs fonctions (Salmivirta *et al.*, 2002). Par exemple, l'ablation génique du nidogène-1 chez la souris induit une augmentation de l'expression et une relocalisation du nidogène-2 ; notamment au niveau des muscles et du cœur (Murshed *et al.*, 2000).

Des souris déficientes pour les deux isoformes présentent une forte mortalité néonatale causées par de sévères anomalies du cœur, des poumons et des membres, en corrélation avec des ruptures au niveau des membranes basales (Bader *et al.*, 2005 ; Böse *et al.*, 2006). Cependant, de nombreux autres tissus présentent une membrane basale normale dans ces conditions, démontrant que les autres constituants peuvent s'assembler et former une membrane basale en l'absence des nidogènes. Ainsi, les nidogènes seraient impliqués de façon tissu-spécifique dans la formation et l'intégrité des membranes basales. Concernant plus particulièrement la peau, des souris doublement déficientes en nidogène-1 et -2 possèdent une JDE correcte (Mokkapati *et al.*, 2008). Cependant, une étude utilisant un système de cocultures a montré qu'*in vitro* l'absence des deux nidogènes empêche la formation d'une membrane basale cutanée et des hémidesmosomes, mais n'affecte pas la formation d'un épiderme stratifié (Nischt *et al.*, 2007). Dans cette étude, l'ajout de nidogène-1 ou -2 recombinant permet de rétablir la formation d'une membrane basale. Récemment, l'équipe de R. Nischt du laboratoire de dermatologie de l'Université de Cologne (Allemagne) a d'ailleurs mis en évidence que les domaines requis pour l'assemblage de la membrane basale diffèrent selon l'isoforme de nidogène (Bechtel *et al.*, 2012). En effet, pour le nidogène-1 les domaines

G2 et G3 sont nécessaires tandis que pour le nidogène-2, seuls le segment reliant G2 à G3 et le domaine G3 sont requis.

2.2.4. Le perlécan

Comme les autres constituants majoritaires de la membrane basale, le perlécan a été isolé à partir de la membrane basale produite par la tumeur EHS (Hassell *et al.*, 1980). La protéine cœur du perlécan fait environ 470 kDa, et est composée de 5 domaines (domaines I-V) (**Figure 5A**). Il doit son nom au fait que sa structure en microscopie électronique ressemble à un collier de perles (Noonan *et al.*, 1991). L'extrémité N-terminale du perlécan (domaine I) possède des sites de fixation à trois chaînes d'héparane sulfate : c'est donc un HSPG (Costell *et al.*, 1997). Les différents domaines du perlécan ainsi que ses chaînes GAG sont les sites d'interaction à de nombreux ligands tels que des facteurs de croissance, des cellules ou d'autres protéines de la membrane basale. En effet, le perlécan peut interagir (**Figure 5B**) via ses chaînes héparane sulfate avec la laminine et le collagène IV, et se lier via sa protéine cœur (domaines IV et V) aux nidogènes, à la fibuline-2 et à la fibronectine (Battaglia *et al.*, 1992 ; Hopf *et al.*, 1999). Les chaînes héparane sulfate du perlécan ont également la capacité de lier des cytokines ou des facteurs de croissance comme le FGF (pour *fibroblast growth factor*) et le VEGF (pour *vascular endothelial growth factor*), permettant ainsi leur stockage ou leur libération suite à l'action de protéases ou d'héparanases (pour revue : Whitelock *et al.*, 2008). Le perlécan permettrait ainsi de moduler des phénomènes physiologiques et pathologiques comme l'angiogenèse, la migration, la croissance et la prolifération cellulaire. Bien que n'étant pas requis pour le dépôt des constituants au niveau de la membrane basale cutanée, le perlécan semblerait avoir un rôle essentiel dans la formation d'un épiderme stratifié (Sher *et al.*, 2006). En effet, la délétion de cette protéine dans des kératinocytes conduit à un épiderme fin et peu organisé, dû à une apoptose prématurée de ces cellules. L'ajout d'un ligand du perlécan impliqué dans la formation de la peau, le FGF7, protégerait ces cellules de l'apoptose et permettrait de rétablir un épiderme plus épais. Le perlécan régulerait donc la survie et la différenciation terminale des kératinocytes en contrôlant la biodisponibilité de certains facteurs de croissance via ses chaînes héparane sulfate.

Les souris déficientes en perlécan présentent une mortalité embryonnaire et périnatale importante, due à des détériorations dans les membranes basales qui subissent un stress mécanique élevé comme celles du myocarde ou du cerveau, suggérant un rôle important du perlécan dans l'intégrité des membranes basales (Costell *et al.*, 1999 ; Arikawa-Hirasawa

et al., 1999). Les autres membranes basales présentent une morphologie normale, ce qui pourrait s'expliquer par un phénomène de compensation de la part d'autres HSPG, comme l'agrine qui est présente dans la plupart des membranes basales et peut aussi se lier à des facteurs de croissance. En dehors des membranes basales, le perlécan semble avoir également un rôle important dans l'intégrité du cartilage puisque sa délétion chez des souris conduit à des troubles du développement osseux (chondrodysplasie) (Costell *et al.*, 1999 ; Arikawa-Hirasawa *et al.*, 1999).

2.2.5. Autres constituants de la membrane basale

En plus de ces quatre protéines majoritairement retrouvées dans toutes les membranes basales de l'organisme, il existe d'autres constituants présents en plus faibles quantités, et souvent spécifiques d'un tissu particulier.

La fibronectine est une glycoprotéine constituée de deux sous-unités d'environ 250 kDa reliées par des ponts disulfures, qui peut s'auto-associer pour former des fibrilles. La fibronectine a la capacité d'interagir avec d'autres molécules de la matrice extracellulaire (nidogènes, collagènes, fibrine ...) et avec des intégrines, ce qui lui permet de jouer un rôle important dans l'adhésion, la migration et la croissance cellulaire, ainsi que dans la cicatrisation (pour revue : Pankov & Yamada, 2002).

La fibuline est une glycoprotéine d'environ 50 à 100 kDa pouvant s'associer aux membranes basales ainsi qu'aux fibres élastiques (pour revue : Timpl *et al.*, 2003). Il existe sept fibulines, dont les plus étudiées sont les fibulines-1 et -2 qui possèdent un vaste répertoire d'interaction avec les constituants de la membrane basale (nidogènes, laminine, perlécan, fibronectine), contribuant ainsi à son organisation supramoléculaire.

Le collagène de type VII est crucial pour l'intégrité de la membrane basale cutanée, bien que représentant seulement 0,001 % des collagènes présents dans la peau (Bruckner-Tuderman *et al.*, 1987). En effet, cet homotrimère composé de trois chaînes $\alpha 1(\text{VII})$ s'assemble en dimère pour former les fibres d'ancrage, et permet de connecter la JDE au derme papillaire (Sakai *et al.*, 1986). Il a la particularité d'avoir la triple hélice la plus longue de tous les collagènes (450 nm).

Le collagène de type XVII, également nommé BPAG2 (pour *180-kDa bullous pemphigoid antigen*), est un constituant des filaments d'ancrage. C'est une protéine transmembranaire, composée de trois chaînes $\alpha 1(\text{XVII})$, dont la partie C-terminale est extracellulaire (Li *et al.*, 1993). Sa région N-terminale fait quant à elle partie intégrante des hémidesmosomes.

Les collagènes de type XV et XVIII sont également retrouvés au sein des membranes basales. Ce sont des hybrides collagène-protéoglycanes, puisque des chaînes héparane sulfate (collagène XVIII) ou chondroïtine sulfate (collagène XV) leur sont accrochées. Ils appartiennent à la famille des multiplexines car ils possèdent de multiples interruptions au sein de leur triple hélice (pour revue : Ricard-Blum, 2011). Le collagène XV (200 kDa) confère une stabilité mécanique importante aux muscles squelettiques et aux vaisseaux, notamment en reliant la membrane basale aux fibres de collagènes sous-jacentes (Amenta *et al.*, 2005). Le collagène XVIII (300 kDa) jouerait un rôle important dans la vision (Marneros & Olsen, 2005) et est le précurseur de l'endostatine, un fragment à activité anti-angiogénique (pour revue : Iozzo, 2005).

L'agrine est un HSPG de plus de 400 kDa (protéine cœur d'environ 220 kDa) présent dans les membranes basales musculaires et neuromusculaires (Tsen *et al.*, 1995). Cette protéine induit l'agrégation des récepteurs de l'acétylcholine au niveau de la jonction neuromusculaire, étape nécessaire à la transduction du signal entre le neurone et le muscle. L'agrine est également retrouvé dans la membrane basale glomérulaire, où il prend part à la filtration rénale (Groffen *et al.*, 1998).

La protéine SPARC (pour *secreted protein acidic and rich in cysteine*), également appelée BM-40 ou ostéonectine, a d'abord été détectée dans la matrice des os, puis des études ont montré une plus large distribution de cette protéine au sein des membranes basales (Dziadek *et al.*, 1986). SPARC interagit avec de nombreux constituants de la matrice extracellulaire comme les collagènes fibrillaires, le collagène IV et les nidogènes ; et participe ainsi à l'organisation de la matrice extracellulaire et de la membrane basale. Comme un grand nombre de protéines matricielles, SPARC peut également influencer le comportement cellulaire via des interactions avec la surface de cellules et de facteurs de croissance (pour revue : Bradshaw & Sage, 2001).

2.3. Mécanisme d'assemblage de la membrane basale

Les hétérotrimères de laminines et les protomères de collagènes de type IV se forment dans l'appareil de Golgi puis sont sécrétés comme le perlécan et les nidogènes dans l'espace extracellulaire via des vésicules de sécrétion (**Figure 6**) (pour revue : Yurchenco & Patton, 2009). Les laminines se lient via leurs domaines LG à des récepteurs à la surface des cellules tels que les intégrines $\beta 1$ et $\beta 4$ et le dystroglycan, et s'auto-assemblent en formant un réseau en forme d'alvéoles d'abeille (Yurchenco *et al.*, 1992). En effet, les hétérotrimères de laminines se lient en oligomères via les domaines LN de chaque chaîne, mécanisme qui est calcium-dépendant (Yurchenco *et al.*, 1985). En parallèle, les collagènes de type IV s'auto-assemblent également (Yurchenco & Ruben, 1987) : quatre protomères de collagènes IV interagissent en joignant leurs domaines 7S, et deux protomères peuvent s'associer via leurs domaines NC1 (Timpl *et al.*, 1981). Ces deux réseaux forment la trame de la membrane basale et sont cruciaux pour sa stabilité. L'initiation de la formation de la membrane basale requiert la présence de la laminine (Smyth *et al.*, 1999). En effet, la délétion chez la souris du gène *LAMC1* codant pour la chaîne $\gamma 1$, présente dans 10 des 16 isoformes de laminine, empêche la formation de toute membrane basale ; les autres constituants n'étant pas capables dans ces conditions de s'assembler en une membrane basale organisée. La stabilité mécanique de la membrane basale est quant à elle dépendante du réseau de collagène IV puisque sa délétion génique entraîne une forte létalité embryonnaire causée par des ruptures de l'intégrité de certaines membranes basales, comme la membrane de Reichert (Pöschl *et al.*, 2004). Le nidogène, grâce à ses deux sites distincts de liaison au collagène IV et à la laminine, situés respectivement dans les domaines G2 et G3, permet de connecter ensemble ces deux réseaux (Fox *et al.*, 1991). C'est donc un élément crucial à la stabilité de la membrane basale ; le collagène IV et la laminine ne pouvant pas interagir directement ensemble. De plus, il permet d'intégrer à la membrane basale d'autres constituants via son large répertoire d'interaction, comme le perlécan. Ce dernier peut lui aussi relier les deux réseaux via de multiples interactions impliquant ses chaînes héparane sulfate et sa protéine cœur, et intégrer d'autres molécules (fibuline, fibronectine).

Ce mécanisme d'assemblage a été exploré récemment par l'extraction à partir d'une membrane basale de chaque superstructure de protéines, via des anticorps couplés à des billes magnétiques (Behrens *et al.*, 2012). Les auteurs de cette étude suggèrent qu'au niveau de la JDE, la molécule clé permettant de relier les deux réseaux de collagènes IV et de laminines

serait le perlécan et non les nidogènes, puisqu'en l'extrayant, les auteurs obtiennent la séparation de ces deux réseaux, phénomène qu'ils n'observent pas lors de l'extraction des nidogènes. Cependant, des souris déficientes en perlécan ne présentent pas d'anomalies au niveau de la JDE (Costell *et al.*, 1999). L'assemblage des membranes basales est donc un processus complexe, faisant appel très probablement de façon conjointe au perlécan, aux nidogènes et à d'autres constituants minoritaires (fibulines, fibronectine...) afin de connecter efficacement les deux superstructures.

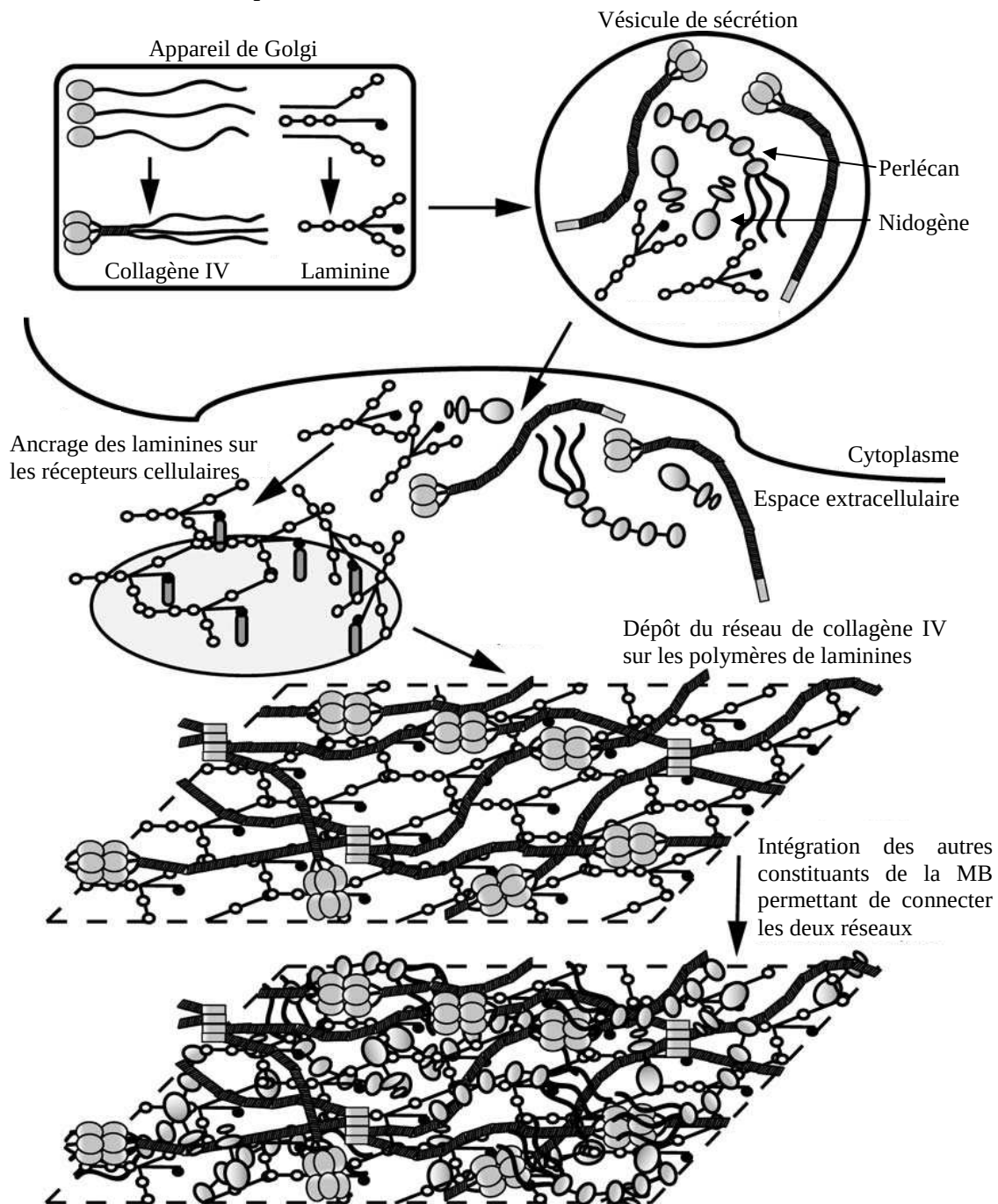


Figure 6 : Mécanisme d'assemblage de la membrane basale.
(d'après LeBleu *et al.*, 2007)

2.4. Altérations de la membrane basale lors du vieillissement

Outre les altérations tissulaires, le processus de vieillissement conduit également à des modifications importantes dans la structure et la composition des membranes basales.

Au niveau de l'œil, la membrane basale séparant la rétine du corps vitré peut être facilement isolée et étudiée. Avec l'âge, cette membrane apparaît plus épaisse et irrégulière (Candiello *et al.*, 2010). D'autres membranes basales humaines présentent également un épaissement lié à l'âge, incluant des membranes basales de capillaires musculaires (Xi *et al.*, 1982) et des membranes basales glomérulaires (Anderson & Brenner, 1986). Ces changements morphologiques s'accompagnent de changements dans la composition biochimique des membranes basales. En effet, l'expression du collagène IV est augmentée avec l'âge dans la rétine (Candiello *et al.*, 2010) comme dans les membranes basales vasculaires cérébrales (Uspenskaia *et al.*, 2004). De la même façon les nidogènes sont plus fortement exprimés avec l'âge dans la rétine (Kunze *et al.*, 2010), tandis que dans cette même membrane basale, la laminine aurait tendance à diminuer avec l'âge (Candiello *et al.*, 2010). L'augmentation de certains constituants des membranes basales suggère une réduction du turn-over de ces protéines avec l'âge suite à un déséquilibre entre la synthèse de ces constituants et leur dégradation protéolytique.

Concernant plus particulièrement la peau, l'âge entraîne un aplatissement de la JDE. En effet, la peau âgée est dépourvue des crêtes épidermiques qui habituellement se projettent dans le derme et donnent à la JDE un aspect ondulé (Hull & Warfel, 1983). Sa surface est donc réduite, passant d'une moyenne de 2,64 mm² chez des sujets jeunes à 1,90 mm² chez des sujets âgés (Katzberg, 1958). Cela contribue à augmenter la fragilité de la peau avec l'âge et à réduire le transfert de nutriments entre les deux compartiments de la peau. De plus, la peau âgée présente des ruptures au niveau de la JDE et des duplications de la *lamina densa*, ces altérations étant nettement accentuées avec la photo-exposition (Lavker, 1979). Ces ruptures sont l'œuvre de protéases qui sont sur-exprimées après irradiation UV, en particulier les MMP (Amano, 2009). La composition de la JDE semble également beaucoup varier en fonction de l'âge, le collagène IV étant réduit (Vázquez *et al.*, 1996 ; Le Varlet *et al.*, 1998) ainsi que la laminine, le collagène VII (Craven *et al.*, 1997) et le perlécane (Maquart *et al.*, 2010). Le statut des nidogènes en fonction de l'âge au niveau de la peau n'a à ce jour pas été communiqué. Au vu des importantes modifications qui se produisent au niveau de la JDE durant le processus de vieillissement cutané, les industries cosmétiques s'intéressent de plus en plus à en cibler les

constituants majoritaires ; notamment via des ingrédients visant à augmenter l'expression de ces molécules nécessaires à l'intégrité de la peau, ou à les empêcher d'être dégradées de façon excessive par des enzymes protéolytiques (Reymermier *et al.*, 2003 ; Bauza *et al.*, 2003 ; Sok *et al.*, 2008).

2.5. Altérations génétiques de la membrane basale

La génération de souris déficientes et la mise en évidence de maladies humaines associées à des anomalies ou déficiences en constituants de la membrane basale (**Tableau 3**) démontrent que ces protéines sont critiques pour la fonction de certains organes et tissus (pour revue : Van Agtmael & Bruckner-Tuderman, 2010). La plupart de ces pathologies sont des maladies rares, et les prévalences indiquées ci-après concernent l'Europe et sont issues du site internet Orphanet (<http://www.orpha.net>). Il est à noter qu'aucune pathologie humaine n'a été à ce jour associée à des mutations dans les gènes codant pour les deux membres de la famille du nidogène.

Tableau 3 : Phénotypes des souris mutantes et maladies génétiques humaines liées à des déficits en protéines de la membrane basale.

(d'après LeBleu *et al.*, 2007)

Constituants	Phénotypes des souris mutantes	Maladies génétiques humaines	Organes touchés
Collagène IV			
$\alpha 1$	Hémorragie cérébrale, porencéphalie Glomérulopathie	Porencéphalie héréditaire	Cerveau Reins
$\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5$	Létalité, glomérulopathie	Syndromes d'Alport et de Goodpasture	Reins, poumons
Laminine			
$\alpha 2$	Létalité, dystrophie musculaire	Dystrophie musculaire congénitale	Muscles
$\beta 2$	Létalité, dysfonction rénale	Syndrome néphrotique	Reins
$\beta 3/\alpha 3$	Formation de vésicules sur la peau	Épidermolyse bulleuse	Peau
$\gamma 1$	Létalité embryonnaire, rupture du blastocyte	-	-
Nidogène			
nid-1	Viable, fertile	-	-
nid-2	Viable, fertile	-	-
nid-1/-2	Développement anormal des poumons et du cœur	-	Poumons, cœur
Perlécane	Chondrodysplasie sévère	Syndrome de Schwartz-Jampel	Os

2.5.1. Pathologies génétiques associées au collagène de type IV

2.5.1.1 Syndrome d'Alport

Le syndrome d'Alport est une maladie héréditaire caractérisée par de l'hématurie et une insuffisance rénale progressive liées à une membrane basale glomérulaire défective. Certains patients présentent également une perte de l'audition et des lésions oculaires. Le syndrome d'Alport est causé par des mutations dans les chaînes $\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$ ou $\alpha 5(\text{IV})$ du collagène IV. Des mutations dans les chaînes $\alpha 3(\text{IV})$ et $\alpha 4(\text{IV})$ impactent uniquement les réseaux constitués des collagènes $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(\text{IV})$ tandis que des mutations dans la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ affectent à la fois les réseaux de collagènes $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 5\alpha 5\alpha 6(\text{IV})$ (Gubler, 2008). Cette maladie génétique qui touche 1 personne sur 50 000 est soit liée à l'X, autosomale récessive ou autosomale dominante. La membrane basale glomérulaire y est altérée (épaissie ou au contraire amincie) et présente de nombreuses ruptures, ce qui conduit à un dysfonctionnement de la filtration du sang par les reins et à terme une insuffisance rénale sévère.

2.5.1.2 Syndrome de Goodpasture

C'est une affection auto-immune très rare (prévalence : 1/150 000), caractérisée par une glomérulonéphrite et une hémorragie pulmonaire, dues à la formation d'auto-anticorps dirigés contre le domaine NC1 de la chaîne $\alpha 3(\text{IV})$ des membranes basales glomérulaires et des alvéoles pulmonaires (Salama *et al.*, 2001). Les épitopes sont localisés à proximité du domaine NC1, ce qui les rend inaccessibles aux auto-anticorps en conditions normales, le collagène IV étant associé en hexamère (Hudson *et al.*, 2003). En effet, dans cette conformation, deux triples hélices de collagène IV interagissent ensemble au niveau du domaine NC1, les épitopes sont alors enfouis. L'exposition des épitopes cryptiques a lieu lorsque l'hexamère est dissocié, phénomène favorisé par des facteurs environnementaux comme la fumée de cigarette, la pollution et les ROS (Kalluri *et al.*, 2000). Le syndrome de Goodpasture est une maladie grave, qui nécessite un diagnostic précoce afin de préserver la fonction rénale.

2.5.2. Pathologies génétiques associées à la laminine

2.5.2.1 Dystrophie musculaire congénitale avec déficit en mérosine

Les dystrophies musculaires congénitales sont des pathologies d'origine génétique caractérisées par une faiblesse musculaire, se manifestant dès la naissance ou durant les premiers mois de la vie. La plus fréquente de ces pathologies est la dystrophie musculaire congénitale associée à un déficit en mérosine, ancien nom de la chaîne $\alpha 2$ de la laminine. En effet, cette maladie autosomique récessive est causée par des mutations dans le gène *LAMA2* (Helbling-Leclerc *et al.*, 1995) et touche environ 1 personne sur 30 000. Ces patients présentent également des anomalies au niveau de la substance blanche du cerveau. La dystrophie musculaire résulte de l'incapacité de la membrane basale musculaire, déficiente en réseaux de laminine- $\alpha 2$, à interagir avec le complexe dystrophine-protéines associées, complexe permettant de relier la membrane basale musculaire au cytosquelette (Jimenez-Mallebrera *et al.*, 2005).

2.5.2.2. Épidermolyse bulleuse (EB)

Le terme « épidermolyse bulleuse » couvre plusieurs pathologies héréditaires caractérisées par une fragilité cutanée conduisant à la formation de cloques ou bulles à la surface de la peau, dues à une séparation entre l'épiderme et le derme (pour revue : Shinkuma *et al.*, 2011). Ces bulles se forment spontanément ou à la suite de traumatismes minimes comme le frottement des vêtements, et peuvent s'infecter. La prévalence exacte de ces maladies est inconnue mais elles touchent environ 1 cas sur 150 000 à 1 000 000 naissances. Il existe quatre catégories d'épidermolyse bulleuse (EB), selon le niveau où se produit la séparation tissulaire : l'EB simple, l'EB jonctionnelle, l'EB dystrophique et le syndrome de Kindler (Fine *et al.*, 2008). Seules les EB jonctionnelle et dystrophique sont réellement des maladies associées à la membrane basale, les autres résultant plutôt d'anomalies au niveau des kératinocytes. L'EB jonctionnelle est causée par des mutations dans les gènes *LAMA3*, *LAMB3* et *LAMC2* codant pour la laminine-332, ainsi que dans le gène codant le collagène XVII (Pulkkinen & Uitto, 1999). Les filaments d'ancrage étant affectés, l'épiderme et le derme se séparent au niveau de la *lamina lucida*. L'EB jonctionnelle peut également atteindre les ongles et les cheveux. L'EB dystrophique est quant à elle due à des mutations dans le gène codant le collagène VII. Ici, la séparation s'effectue à proximité du derme, au niveau des fibres d'ancrage de la *lamina reticularis*. Les bulles, qui sont formées dans le derme papillaire, guérissent lentement et donnent lieu à des cicatrices.

2.5.2.3. Autres implications

Des déficiences en laminine sont également associées à d'autres maladies. En effet, des mutations dans la chaîne $\beta 2$ sont responsables du syndrome de Pierson (Zenker *et al.*, 2004). C'est une pathologie autosomique récessive très rare (prévalence $< 1/1\,000\,000$), caractérisée par des anomalies oculaires et un syndrome néphrotique conduisant à terme à une insuffisance rénale. Ces patients présentent également des phénotypes neuromusculaires anormaux tels que faiblesse musculaire et fatigabilité, symptômes retrouvés chez des souris *Lamb2*^{-/-} (Noakes *et al.*, 1995). Des mutations dans la chaîne $\alpha 4$ constituant les laminines-411 et -421, présentes dans les membranes basales du cœur et des vaisseaux sanguins, sont en partie responsables de cardiomyopathies humaines (Knöll *et al.*, 2007). Ces mutations empêchent la formation des domaines LG de la chaîne $\alpha 4$, qui ne peuvent plus interagir avec les intégrines. L'attachement des cellules endothéliales et des cardiomyocytes à la matrice extracellulaire est donc compromis, ce qui cause une hémorragie et une insuffisance cardiaque.

2.5.3. Pathologies génétiques associées au perlécan

2.5.3.1. Syndrome de Schwartz-Jampel

Ce désordre non létal autosomal récessif est causé par des mutations dans le gène *HSPG2*, résultant en une sécrétion réduite et un perlécan partiellement fonctionnel (Nicole *et al.*, 2000). Le syndrome de Schwartz-Jampel est caractérisé par une myotonie permanente (trouble de la relaxation musculaire) et une chondrodysplasie (trouble du développement osseux). On estime que ce syndrome touche moins d'une personne sur un million. La chondrodysplasie résulte d'une désorganisation des chondrocytes et d'une réduction du dépôt de matrice extracellulaire, probablement due à la diminution de l'expression du perlécan, puisque cette protéine est requise pour la fibrillogenèse des collagènes dans les chondroplastes (Kvist *et al.*, 2006). Chez la souris, des mutations dans le gène du perlécan résultent en un phénotype similaire au syndrome de Schwartz-Jampel (Rodgers *et al.*, 2007).

2.5.3.2. Dysplasie dyssegmentaire de type Silverman-Handmaker

Comme dans le cas du syndrome de Schwartz-Jampel, cette pathologie est causée par des mutations dans le gène *HSPG2* (pour revue : Arikawa-Hirasawa *et al.*, 2001). Cependant, ici ces mutations conduisent à une absence totale de sécrétion du perlécan, rendant cette pathologie létale à la naissance ou durant les premiers jours de la vie. Le tableau clinique

inclut un nanisme, un encéphalocèle (extériorisation d'une partie du cerveau), ainsi qu'une myotonie et une chondrodysplasie. Ici encore, l'absence de perlécan déstabiliserait la matrice du cartilage et serait responsable de la chondrodysplasie.

2.6. La membrane basale, cible des protéases

Les constituants des membranes basales sont les cibles de protéases, que ce soit en conditions physiologiques lors des phénomènes de développement, renouvellement et réparation tissulaires, ou pathologiques en cas d'irradiation UV, d'inflammation ou encore d'invasion tumorale. La formation de la membrane basale nécessite par ailleurs l'équilibre de la balance entre synthèse et dégradation protéolytique de ses constituants (Amano *et al.*, 2001). En effet, dans des modèles de culture organotypique, la JDE ne se forme que rarement, du fait de l'absence d'inhibiteurs de protéases dans le milieu de culture, ce qui entraîne une dégradation trop importante et empêche le dépôt des protéines à l'interface entre le derme et l'épiderme. Ainsi, dans cette étude, l'ajout d'inhibiteurs de MMP permet de retrouver une JDE correcte.

Les membres de la famille des MMP peuvent cliver presque toutes les protéines de la matrice extracellulaire, mais possèdent des spécificités de substrats (pour revue : Klein & Bischoff, 2010). La MMP-19 est capable de dégrader à la fois la laminine-111, le collagène IV et le nidogène-1 (Stracke *et al.*, 2000). La laminine-332 est clivée par les MMP-2 et -14 (Koshikawa *et al.*, 2005), et le collagène IV par les MMP-2, -3 et -9. Le perlécan est quant à lui hydrolysé par les MMP-1 et -13 (Leeman *et al.*, 2002). Le nidogène-1 est dégradé par les MMP-1, -3, -7, -9 et -12 (Mayer *et al.*, 1993 ; Sires *et al.*, 1993 ; Gronski *et al.*, 1997). Les sites de clivage du nidogène-1 par les MMP sont localisés plus particulièrement dans des régions dites « sensibles à la protéolyse », dans le segment reliant G1 à G2, et dans le domaine G3. Bien qu'étant plus résistant une fois complexé à la laminine (Dziadek *et al.*, 1988), le nidogène-1 est une protéine sensible à la protéolyse. Cette caractéristique est par ailleurs considérée comme étant essentielle au remodelage de la membrane basale (Dziadek *et al.*, 1985).

Bien que l'on fasse le plus souvent référence aux MMP en ce qui concerne la dégradation de la matrice extracellulaire, d'autres classes de protéases peuvent également intervenir. En effet, le nidogène-1 est également sensible à la protéolyse par les protéases à sérine : la thrombine, la trypsine, l'élastase leucocytaire, la chymase et la kallicréine plasmatique (Mann *et al.*,

1988 ; Mayer *et al.*, 1993). Comme pour les MMP, les protéases à sérine clivent le nidogène-1 plus particulièrement au niveau de ses régions dites « sensibles à la protéolyse ». La laminine est hydrolysée par la trypsine, la chymotrypsine, l'élastase, la subtilisine et la kallikréine KLK6 (Ott *et al.*, 1982 ; Ghosh *et al.*, 2004). Le collagène IV peut quant à lui être dégradé par les kallikréines KLK4, KLK6, KLK8, KLK14 (Magklara *et al.*, 2003 ; Rajapakse *et al.*, 2005 ; Obiezu *et al.*, 2006 ; Rajapakse & Takahashi, 2007).

Les protéases acides sont des enzymes assez peu caractérisées en comparaison des MMP et des protéases à sérine, et peu de choses sont décrites quant à leur implication dans la dégradation de protéines matricielles. Cependant, il est bien acquis que la pepsine, protéase digestive présente dans les sucs gastriques, est capable de dégrader le collagène IV, la laminine et le perlécan (Timpl *et al.*, 1979b ; Rohde *et al.*, 1980 ; Schulze *et al.*, 1996). La cathepsine D peut quant à elle cliver les collagènes et les protéoglycanes du cartilage (Benes *et al.*, 2008). Les cathepsines à cystéine sont également une classe de protéases impliquées dans la dégradation des protéines de la membrane basale (voir Chapitre 3.3.1.4).

La plupart des protéines de la membrane basale possèdent des domaines cryptiques cachés au sein de la molécule parente, qui peuvent être libérés ou exposés suite à un clivage protéolytique. Ces fragments, appelés matricryptines, possèdent des activités biologiques à part entière. Les matricryptines se lient à leurs récepteurs avec une faible affinité, leur constante de dissociation K_d étant de l'ordre du micromolaire, contrairement aux facteurs de croissance qui interagissent avec leurs récepteurs avec des K_d se situant entre le nanomolaire et le picomolaire (pour revue : Tran *et al.*, 2005). Les principaux effets biologiques associés aux matricryptines sont listés **Tableau 4**. Certaines matricryptines stimulent la migration cellulaire, notamment durant la réparation tissulaire ou la progression tumorale, comme les motifs de type EGF contenus dans les laminines (Giannelli *et al.*, 1997). Les matricryptines peuvent également réguler la production de protéases, comme un peptide issu de SPARC qui peut stimuler l'expression de la MMP-9 par les monocytes (Shankavaram *et al.*, 1997), ou encore un hexapeptide provenant de la chaîne $\beta 1$ de la laminine, qui, lui, augmente l'expression de la MMP-2 par les fibroblastes (Huet *et al.*, 2001). D'autres agissent comme des facteurs anti-angiogéniques, tels les peptides dérivés des différentes chaînes du collagène IV : l'arrestène ($\alpha 1(IV)NC1$), la canstatine ($\alpha 2(IV)NC1$) et la tumstatine ($\alpha 3(IV)NC1$) (pour revue : Kalluri, 2003a). Il en est de même pour l'endorépelline, correspondant au domaine V du perlécan, ainsi que pour l'endostatine et la restine, fragments

C-terminaux issus respectivement des collagènes de type XVIII et XV. Des fragments C-terminaux du nidogène, nommés vascostatines, auraient également des propriétés anti-angiogéniques (Kalluri, 2003b). Les protéases impliquées dans la libération de ces matricryptines appartiennent à toutes les classes de protéases. La tumstatine est obtenue après l'action des MMP-2 et -9 (Hamano *et al.*, 2003). L'endostatine peut être générée par les MMP-2, -3, -9, -12, -13, -14 et -20 (métalloprotéases), l'élastase (protéase à sérine) et la cathepsine D (protéase acide) (Ferrerias *et al.*, 2000). L'endorépelline est libérée par la plasmine et la thrombine (protéases à sérine) et par les MMP-1 et -3 (Whitelock *et al.*, 1996). Les cathepsines à cystéine sont également impliquées dans la libération de ces fragments. En effet, l'endostatine peut être obtenue suite à un clivage par les cathepsines B, K, L et S (Ferrerias *et al.*, 2000 ; Veillard *et al.*, 2011) et l'endorépelline par la cathepsine L (Cailhier *et al.*, 2008). Certains de ces fragments cryptiques sont donc potentiellement intéressants dans le cadre de thérapies humaines, et à l'heure actuelle des matricryptines dérivées de collagènes, notamment l'endostatine, sont en cours d'essais cliniques comme agents suppresseurs de tumeurs (Marx, 2003).

Tableau 4 : Matricryptines dérivées de la membrane basale.
(d'après Tran *et al.*, 2005)

Matricryptines	Récepteurs	Effets biologiques associés
Répétitions de type EGF de la laminine-5	EGFR	Migration cellulaire
Peptides du domaine NC1 des chaînes du collagène IV (<i>arrestène, canstatine, tumstatine</i>)	Récepteurs de type intégrine	Anti-angiogénique, inhibition de la prolifération cellulaire
Peptides du domaine NC1 des chaînes du collagène XVIII (<i>endostatine</i>)	Récepteurs de type intégrine, VEGF	Anti-angiogénique, inhibition de la migration et de la prolifération cellulaire
Peptides du domaine V du perlécan (<i>endorépelline</i>)	Récepteurs de type intégrine	Anti-angiogénique
Peptides du nidogène (<i>vascostatine</i>)	-	Anti-angiogénique

3. Les cathepsines à cystéine

3.1. Généralités

3.1.1. Classification et phylogénie

Il existe deux classifications pour les protéases, une nomenclature numérique donnée par l'« Enzyme Commission » (EC) et une nomenclature plus récente en clan et famille proposée par Rawlings et Barrett (Rawlings *et al.*, 2004).

3.1.1.1. Nomenclature « EC »

Cette classification numérique des enzymes (<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>), réalisée par la commission des enzymes de l'Union Internationale de Biochimie et de Biologie Moléculaire (ou IUBMB pour *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*), est basée sur la réaction chimique qu'elles catalysent et le substrat impliqué dans la réaction. Ainsi, les protéases font partie de la classe des hydrolases (classe EC 3) et plus particulièrement du groupe des peptidases (EC 3.4) puisqu'elles agissent sur des liaisons peptidiques. Elles sont ensuite réparties en sous-groupes selon la nature des sites de clivage et leur mécanisme catalytique. En effet, de manière générale, on distingue les endopeptidases (EC 3.4.21-99), qui clivent à l'intérieur de leur substrat générant ainsi des peptides plus ou moins longs ; des exopeptidases (EC 3.4.11-19) pour lesquelles le clivage se fait en N-terminal (aminopeptidases) ou en C-terminal (carboxypeptidases) et qui, elles, libèrent des acides aminés libres, des dipeptides ou des tripeptides. Ainsi, les cathepsines à cystéine humaines ne sont pas toutes classées dans le même sous-groupe. En effet, la majorité d'entre elles fait partie du sous-groupe EC 3.4.22 (en tant qu'endopeptidases), mais certaines, comme la cathepsine C (EC 3.4.14) et la cathepsine X (EC 3.4.18), sont classées à part du fait de leur activité exopeptidasique.

3.1.1.2. Classification en clans et familles

Bien qu'encore utilisée dans les bases de données, la nomenclature EC ne permet pas de comprendre l'évolution phylogénétique et fonctionnelle des enzymes. C'est pourquoi une classification en clan et famille a été mise en place dans le cas des protéases, basée sur leur évolution à partir d'ancêtres communs (Rawlings *et al.*, 2004). Cette nomenclature est par

ailleurs utilisée dans la base de données des protéases, MEROPS database (<http://merops.sanger.ac.uk/>). Le terme famille désigne un groupe d'enzymes dans lequel chaque membre a une relation d'évolution statistiquement significative avec au moins un autre membre, soit dans la séquence entière, soit une partie de la séquence qui est responsable de l'activité catalytique (Rawlings & Barrett, 1993). Un clan comprend un groupe de familles pour lesquelles il y a des indications d'évolution à partir d'un même ancêtre commun, malgré un manque de similarité de séquence. La classification est alors réalisée par comparaison des structures tridimensionnelles, ou l'ordre des résidus constituant le site catalytique.

3.1.1.3. La famille de la papaïne (clan CA, famille C1)

Les protéases à cystéine sont divisées en 7 clans (clans CA, CD, CE, CF, CM, CN et CO) regroupant 72 familles (Rawlings *et al.*, 2012). Parmi celles-ci, la famille de la papaïne, extraite du latex de la papaye *Carica papaya* (famille C1 du clan CA) est la plus abondante et la mieux caractérisée. Elle se divise en trois groupes : les protéases apparentées à la papaïne (famille C1a), les protéases de type bléomycine hydrolase (famille C1b) et les protéases de type calpaïnes (famille C2). La famille de la papaïne comprend des protéases végétales, des protéases de parasites telles que la cruzipaïne (de *Trypanosoma cruzi*, trypanosome responsable de la maladie de Chagas) et les cathepsines à cystéine lysosomales.

Il existe onze cathepsines à cystéine chez l'homme : les cathepsines B, C, F, H, K, L, O, S, V, W et X (**Tableau 5**). Le terme cathepsine, introduit dans les années 1920 (Willstätter & Bamann, 1929), provient du grec « kathepsin » qui signifie digérer. Il a été donné pour des enzymes protéolytiques lysosomales, indépendamment de leur classe d'enzyme. Ainsi, en plus des cathepsines à cystéine, il existe des cathepsines qui sont des protéases à sérine (cathepsines A et G), et des protéases aspartiques (cathepsines D et E). En 1948, la première cathepsine à cystéine à avoir été caractérisée est la cathepsine C (Gutmann & Fruton, 1948), puis jusqu'aux années 1990 les recherches sur ces enzymes ont permis d'identifier les cathepsines B, H, L et S. À cette époque, les cathepsines à cystéine ont été décrites comme des protéines de ménage ayant une expression ubiquitaire, dont le rôle se limitait principalement à la dégradation et au recyclage des protéines intracellulaires au sein des compartiments endosomaux et lysosomaux. Avec l'avancée des techniques de biologie moléculaire puis l'achèvement du séquençage du génome humain en 2003, d'autres cathepsines à cystéine humaines ont été découvertes et caractérisées ces vingt dernières années (les cathepsines F, K, O, V, W et X). De plus, des études réalisées par Northern Blot et

marquage immunohistochimique ont montré que certaines cathepsines ont des distributions plus spécifiques (cathepsines S, K, W et V). En effet, la cathepsine K est retrouvée principalement dans les ostéoclastes, les macrophages et les cellules épithéliales (Brömme *et al.*, 1996a ; Bühling *et al.*, 1999) ; la cathepsine W dans les lymphocytes cytotoxiques (Linnevers *et al.*, 1997) et la cathepsine V dans le thymus, les testicules et la peau (Santamaría *et al.*, 1998 ; Watkinson, 1999). La cathepsine S, quant à elle, est dénommée ainsi car retrouvée en abondance dans la rate (S pour « spleen »), et est également présente dans les cellules présentatrices d'antigène (macrophages, cellules dendritiques) et dans les cellules musculaires lisses (Shi *et al.*, 1994 ; Schwarz *et al.*, 2002).

Tableau 5 : Distribution et pathologies associées aux cathepsines à cystéine humaines.
(d'après Small *et al.*, 2011)

Cathepsine	Spécificité de clivage	Distribution	Maladies associées
B	Endopeptidase Carboxydiptidase	Ubiquitaire	Cancers, arthrite rhumatoïde
C	Aminodipeptidase	Ubiquitaire	Syndrome de Papillon-Lefèvre, syndrome de Haim-Munk
F	Endopeptidase	Macrophages	Cancers
H	Endopeptidase Aminopeptidase	Ubiquitaire	Cancers
K (O2)	Endopeptidase	Ostéoclastes, épithéliums	Ostéoporose, athérosclérose, arthrite rhumatoïde, pycnodysostose
L	Endopeptidase	Ubiquitaire	Cancers, athérosclérose
O	Endopeptidase	Ubiquitaire	Non déterminé
S	Endopeptidase	Cellules présentatrices d'antigène (macrophages, lymphocytes)	Cancers, arthrite rhumatoïde, asthme, emphysème, obésité, athérosclérose, psoriasis
V (L2)	Endopeptidase	Thymus	Cancers
W	Endopeptidase	Cellules CD8+	Gastrite auto-immune
X (Z)	Carboxymono et dipeptidase	Ubiquitaire	Cancers

En plus de leur localisation au sein des lysosomes, des formes actives de cathepsines à cystéine peuvent être sécrétées dans le milieu extracellulaire, où elles participent à la dégradation de protéines de la matrice extracellulaire et de la membrane basale, ainsi qu'à la maturation de protéines (pour revue : Lecaille *et al.*, 2008). La découverte de la localisation tissu-spécifique et de la sécrétion des cathepsines à cystéine a permis de changer l'opinion

générale quant à leur importance physiologique. À l'heure actuelle, il est bien admis que ces enzymes sont impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que la maturation d'hormones et la présentation antigénique, mais également dans des pathologies humaines comme l'asthme, l'ostéoporose, l'invasion tumorale et l'inflammation (pour revue : Kasabova *et al.*, 2011, **Annexe 1**). C'est pourquoi certaines des cathepsines à cystéine sont considérées comme des cibles potentielles pertinentes pour des thérapies humaines. Des inhibiteurs spécifiques de ces protéases ont par ailleurs été développés et sont actuellement en phases d'essais cliniques (voir Chapitre 3.2.7.3) (pour revue : Turk, 2006 ; Vasiljeva *et al.*, 2007).

3.1.2. Structure

Les cathepsines à cystéine sont synthétisées sous forme de préproenzymes (zymogènes) d'environ 50 kDa qui nécessitent d'être clivées et relarguées pour être actives (**Tableau 6**). En effet, la prérégion, correspondant au peptide signal, est clivée une fois les cathepsines adressées au réticulum endoplasmique. Puis le clivage et le relargage de la prorégion est nécessaire afin de libérer la forme mature de l'enzyme.

Tableau 6 : Caractéristiques des cathepsines à cystéine humaines.

N° AC : numéro d'accèsion référencé dans la banque de données Swiss-Prot (d'après Lecaille *et al.*, 2002a).

Nom	N° AC	Peptide signal (AA)	Prodomaine			Domaine mature			Zymogène		Localisation chromosomique
			Taille (AA)	Masse (Da)	pI	Taille (AA)	Masse (Da)	pI	Taille (AA)	Masse (Da)	
Cathepsine L	P07711	17	96	11724	9.0	220	24170	4.7	333	37546	9q21-22
Cathepsine V (L2)	O60911	17	96	11672	9.5	221	23999	8.6	334	37329	9q22
Cathepsine S	P25774	16	98	11830	9.3	217	23993	7.6	331	37479	1q21
Cathepsine O	P43234	23	84	9894	9.8	214	23460	5.8	321	35957	4q31-32
Cathepsine F	Q9UBX1	19	251	27846	9.4	214	23593	5.8	484	53365	11q13.1-3
Cathepsine X (Z)	Q9UBR2	23	38	4338	9.6	242	27149	5.5	303	33858	20q13
Cathepsine B	P07858	17	62	7245	9.6	260	28663	5.2	339	37807	8p22
Cathepsine C	P53634	24	206	23534	8.7	233	26032	5.6	463	51841	11q14.1-3
Cathepsine K (O2)	P43235	15	99	11833	6.3	215	23495	8.9	329	36966	1q21
Cathepsine H	P09668	22	75	9104	9.8	220	24187	5.7	335	37403	15q24-25
Cathepsine W	P56202	21	106	12060	4.8	249	28024	8.9	376	42099	11q13.1-3

Les cathepsines à cystéine sont fortement similaires au niveau de leur domaine catalytique mais diffèrent par la longueur et la composition de leur prorégion. Elles sont ainsi regroupées en 3 familles : les cathepsines « L-like » (cathepsines H, K, L, S et V), les cathepsines « B-like » (cathepsines B, C, O et X) et les cathepsines « F-like » (cathepsines F et W). Les cathepsines « L-like » possèdent une prorégion de 100 résidus environ avec deux motifs conservés au niveau de leur séquence primaire, les motifs ERFNIN et GNFD ; tandis que pour les cathepsines « B-like » la prorégion est plus courte, d'environ 60 résidus, et seul le motif GNFD est conservé (Karrer *et al.*, 1993). Les cathepsines F et W quant à elles possèdent une forme modifiée du motif ERFNIN, le motif ERFNAQ, et sont donc regroupées dans une troisième famille (Wex *et al.*, 1999).

3.1.2.1. La prorégion

La prorégion est importante pour le repliement correct de la chaîne peptidique nouvellement synthétisée, ainsi que pour la stabilisation de la protéase contre la dénaturation qui peut se produire à pH neutre ou légèrement alcalin (Tao *et al.*, 1994). En dépit de la faible homologie de séquence et de longueur entre les prorégions des cathepsines de type B, L ou F, des études de cristallographie ont mis en évidence que les prorégions des cathepsines à cystéine présentent un repliement similaire (Cygler & Mort, 1997). De manière générale, la prorégion est constituée de deux parties (**Figure 7**). La partie N-terminale, de 60 résidus, est composée de deux hélices α et d'un brin β , formant un « minidomaine » compact. Ce domaine interagit avec une boucle (appelée PBL pour *proregion binding loop*) située sur le domaine catalytique, ce qui stabilise le positionnement de la prorégion. La partie C-terminale s'étend le long de la surface de l'enzyme jusqu'au niveau du site actif, où elle forme une courte hélice α , qui par encombrement stérique va bloquer l'accès à des substrats protéiques. Cependant, la prorégion se positionne de façon opposée au mode de liaison des substrats, ce qui la rend résistante à un éventuel clivage.

La prorégion est également un inhibiteur spécifique de l'enzyme parente, qui sert à éviter une maturation précoce (Cygler & Mort, 1997 ; Guay *et al.*, 2000). En effet, le propeptide de la cathepsine B se révèle être un bon inhibiteur de la cathepsine B mature ($K_i = 0,4$ nM), tandis qu'il inhibe très peu la cathepsine L (K_i de l'ordre du micromolaire) (Fox *et al.*, 1992). De la même manière, la cathepsine L est inhibée spécifiquement et sélectivement par son propeptide ($K_i = 0,088$ nM) (Carmona *et al.*, 1996). Cette caractéristique a permis de designer des inhibiteurs sélectifs de la cathepsine L à partir de la séquence de la prorégion (Chowdhury *et al.*, 2002).

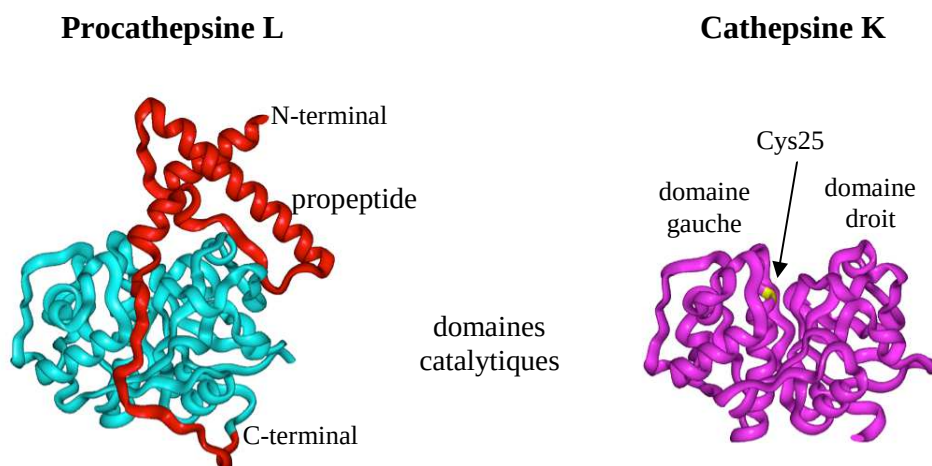


Figure 7 : Représentation des structures tridimensionnelles de la procathepsine L et de la cathepsine K mature.
(d'après Lecaille *et al.*, 2002a)

3.1.2.2. Processus de maturation

Les enzymes responsables de la maturation des cathepsines sont la pepsine et la cathepsine D (protéases acides), la légumaine (protéase à cystéine), ainsi que d'autres protéases présentes dans les lysosomes où se déroule la maturation (Nishimura *et al.*, 1988 ; Rowan *et al.*, 1992). Cependant, les cathepsines endopeptidasiques ont la capacité de s'auto-activer à pH acide : soit par un processus intermoléculaire, pour lequel une cathepsine déjà active va pouvoir cliver les autres procathepsines environnantes (Mach *et al.*, 1994) ; soit par un processus intramoléculaire, où la prorégion va adopter une conformation relâchée du fait de l'acidité du milieu qui perturbe les interactions électrostatiques entre le propeptide et l'enzyme, ce qui va permettre à l'enzyme son automaturation (McQueney *et al.*, 1997). De plus, pour certaines cathepsines telles que les cathepsines B, L et S, la maturation est accélérée en présence de GAG (Mason & Massey, 1992 ; Ishidoh & Kominami, 1994; Vasiljeva *et al.*, 2005). En effet, en interagissant avec la prorégion de la procathepsine B, les GAG interfèrent avec les interactions électrostatiques entre la prorégion et le domaine catalytique. Cela induit un changement de conformation de la prorégion, qui ne va plus recouvrir le site actif, permettant à la cathepsine B de cliver et de libérer sa prorégion (Caglic *et al.*, 2007). Les exopeptidases telles que les cathepsines C et X ne sont, quant à elles, pas capables d'automaturation, et requièrent pour être actives la présence d'autres protéases, dont les cathepsines (Nägler *et al.*, 1999 ; Dahl *et al.*, 2001).

3.1.2.3. Le domaine catalytique

À l'exception de la cathepsine C qui forme un tétramère de 200 kDa, toutes les cathepsines à cystéine matures sont monomériques, avec une masse moléculaire comprise entre 20 et 30 kDa (**Tableau 6**). Leur structure générale consiste en deux domaines de taille similaire, le domaine gauche ou L (pour *Left*) et le domaine droit ou R (pour *Right*) (**Figure 7**). Le domaine L, correspondant au côté N-terminal de la protéine, est composé de trois hélices α , la plus longue étant celle où se situe la cystéine du site actif (McGrath, 1999). Le domaine R, en C-terminal, est constitué de cinq à six feuillets β , formant une structure en tonneau. L'ensemble est stabilisé par des ponts disulfures, en général deux situés dans le domaine L et un dans le domaine R. La disposition de ces deux domaines forme une cavité en forme de « V », dans laquelle se trouvent le site actif et les résidus essentiels à l'activité protéolytique des cathepsines à cystéine : les résidus Cys25 (domaine L), His159 et Asn175 (domaine R), selon la numérotation de la papaïne (McGrath *et al.*, 1995). Les cathepsines B et X possèdent, en plus de cette structure générale commune à toutes les cathepsines à cystéine, une boucle supplémentaire, appelée boucle d'occlusion (Musil *et al.*, 1991 ; Nägler & Ménard, 1998).

3.1.3. Fonctionnement et organisation du site catalytique

3.1.3.1. Mécanisme catalytique

Pour être active, la Cys25 du site actif des cathepsines doit être réduite (S^-) et former une paire ionique thiolate/imidazolium ($Cys-S^-/His-Im^+$) avec l'His159 se trouvant à proximité. Un troisième résidu, l'Asn175, permet de maintenir le bon positionnement de l'His159 via une liaison hydrogène (Storer & Ménard, 1994). Ces trois résidus forment ainsi la triade catalytique des protéases à cystéine. Dès lors que le substrat interagit avec l'enzyme, la première étape consiste en une attaque nucléophile du groupement thiol de l'enzyme sur le groupement carbonyle de la liaison peptidique à cliver. Cela forme un oxyanion, qui va être stabilisé par la présence de liaisons hydrogènes avec la Gln19 et la Cys25 (**Figure 8A-C**). L'His159 perd ensuite son proton, libérant ainsi la partie amine du substrat qui s'y était fixé (**Figure 8D**), et entraînant l'arrivée d'une molécule d'eau, ce qui va permettre la formation d'un intermédiaire acyl-enzyme (**Figure 8E**). Enfin, une étape de déacylation permet la libération de la partie carbonyle du substrat hydrolysé (**Figure 8F**) et l'enzyme redevient de nouveau libre (Storer & Ménard, 1994 ; Rzychon *et al.*, 2004).

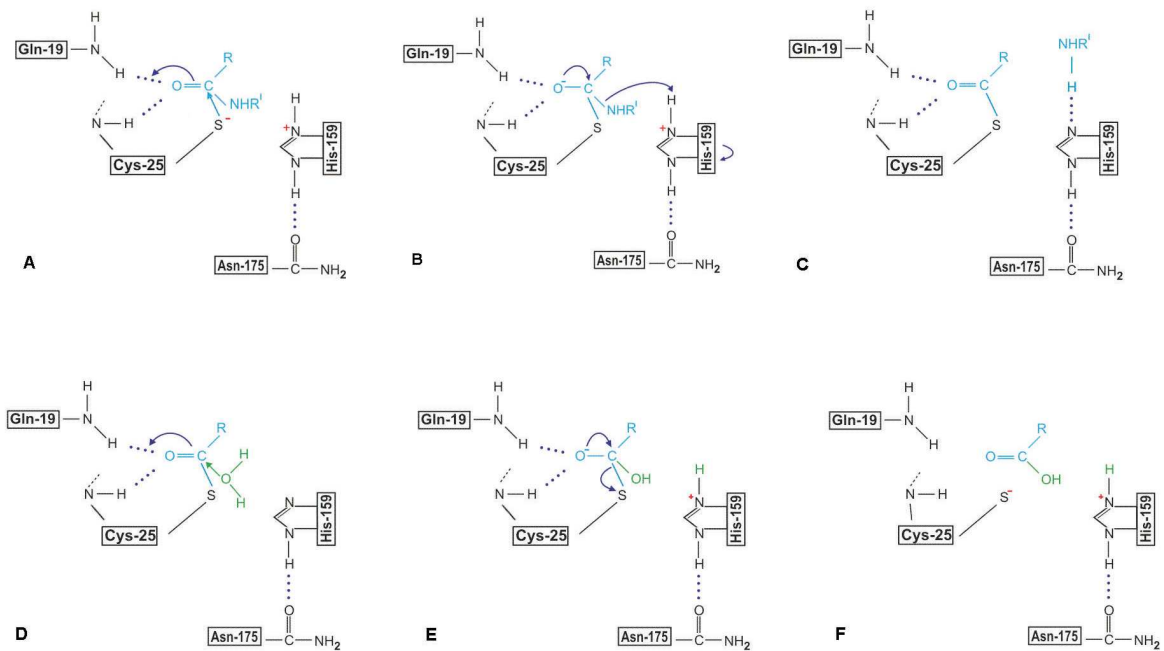


Figure 8 : Mécanisme catalytique des protéases à cystéine.
(Rzychon *et al.*, 2004)

3.1.3.2. Site de liaison au substrat

L'interaction entre le site actif des enzymes et leurs substrats protéiques est défini selon la nomenclature de Schechter et Berger (Schechter & Berger, 1967) par un arrangement de sous-sites (S-S') dans le site actif, interagissant chacun avec un résidu du substrat (P-P'). À partir du site de clivage, les sous-sites sont numérotés S1, S2, ... du côté N-terminal, et S1', S2', ... du côté C-terminal. De la même façon, les résidus du substrat polypeptidique sont notés P1, P2, ... (N-terminal) et P1', P2', ... (C-terminal) (**Figure 9**).

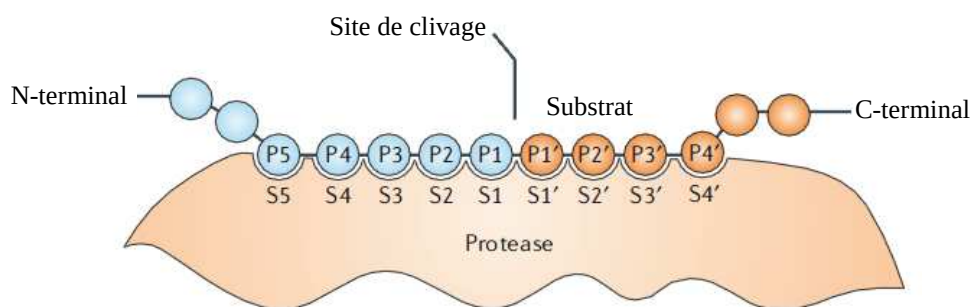


Figure 9 : Illustration de la nomenclature de Schechter & Berger.
(Schechter & Berger, 1967 ; illustration d'après Turk, 2006)

D'après les analyses structurales des complexes cathepsines/inhibiteurs analogues de substrats réalisées par cristallographie, les substrats se positionnent le long de la cavité formée par le site actif, dans une conformation étendue, et forment des liaisons alternées avec les domaines L et R.

3.1.4. Spécificité enzymatique des cathepsines à cystéine

La spécificité enzymatique des protéases dépend de la nature des résidus constituant les sites d'interactions S et S' avec les résidus du substrat. Chez les cathepsines, le sous-site S2 est le seul à former réellement une « poche » bien définie et il est composé de résidus appartenant aux deux domaines L et R des cathepsines. La spécificité des protéases à cystéine repose majoritairement sur l'interaction entre le sous-site S2 et le résidu P2 s'y fixant (McGrath, 1999). La plupart des cathepsines acceptent en S2 des résidus hydrophobes comme la phénylalanine ou la leucine. Cependant il existe des exceptions, qui sont à l'origine de différences de spécificités enzymatiques entre les cathepsines à cystéine ; ces différences ayant été mises en évidence grâce à l'utilisation de banques combinatoires de substrats fluorogéniques et à la réalisation de mutants cathepsines par mutagenèse dirigée au niveau du site actif (Choe *et al.*, 2006). Par exemple, la cathepsine B peut accepter à cette position des résidus basiques, notamment l'arginine, dû à la présence dans la poche S2 d'un acide glutamique Glu205 (Barrett & Kirschke, 1981). La cathepsine K, quant à elle, accepte en S2 de petits résidus hydrophobes comme la proline et la leucine grâce à la présence dans la poche des résidus Tyr67 et Leu205 (Lecaille *et al.*, 2002b ; Lecaille *et al.*, 2007).

Le sous-site S1, moins sélectif que S2, accepte une large variété de résidus mais a toutefois une préférence pour des résidus basiques tels que l'arginine et la lysine (Brocklehurst *et al.*, 1987 ; Kirschke *et al.*, 1995). La spécificité des autres sous-sites, notamment les sous-sites S', est peu définie, hormis le sous-site S2' pour lequel il est montré une préférence pour le tryptophane.

3.1.5. Particularité des exopeptidases

La famille des cathepsines à cystéine comprend principalement des endopeptidases, mais certaines d'entre elles ont également des activités exopeptidasiques (cathepsines B, C, H et X). Cette caractéristique est due à la présence sur ces enzymes d'éléments structuraux

supplémentaires qui vont limiter le nombre de sites de fixation aux substrats (**Figure 10**). En effet, d'une part ces éléments empêchent la fixation de substrats longs, mais ils servent également à ancrer la partie N-terminale du substrat (pour les aminopeptidases) ou C-terminale (dans les cas des carboxypeptidases) par des liaisons électrostatiques (Turk *et al.*, 2003).

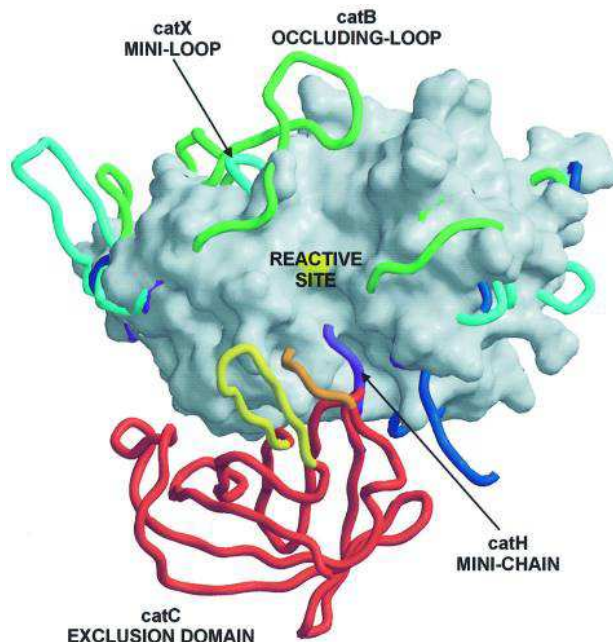


Figure 10 : Caractéristiques structurales des cathepsines à cystéine à activité exopeptidasique.

Superposition du domaine catalytique de la cathepsine L (gris) avec les exodomains des cathepsines X (turquoise), B (vert), C (rouge) et H (violet) (Turk *et al.*, 2001a).

La cathepsine B possède 18 résidus supplémentaires qui forment une structure appelée « boucle d'occlusion », limitant l'accès au site actif. La suppression de cette boucle résulte en une forte augmentation de l'activité endopeptidasique de la cathepsine B (Nägler *et al.*, 1997). Cette boucle possède des résidus chargés positivement (deux histidines : His110 et His111) qui permettent l'ancrage du groupe carbonyle C-terminal du substrat, conférant à la cathepsine B une activité carboxypeptidasique. De la même façon, la cathepsine X possède 3 résidus supplémentaires, formant une mini-boucle (Nägler *et al.*, 1999). À l'inverse, les cathepsines C et H, qui sont des aminopeptidases, possèdent sur leurs exodomains des groupements chargés négativement, qui vont ancrer les charges positives situées à l'extrémité N-terminale des substrats. Pour la cathepsine H, ce sont 8 résidus de la prorégion qui restent attachés au domaine catalytique et forment une mini-chaîne (Guncar *et al.*, 1998), tandis que pour la cathepsine C, il s'agit du domaine d'exclusion, un appendice unique chez les cathepsines, qui lui permet également de s'assembler en tétramère (Turk *et al.*, 2001a).

3.1.6. Localisation cellulaire des cathepsines à cystéine

3.1.6.1. Voie d'adressage vers les lysosomes

Les cathepsines sont synthétisées sous forme de préproenzymes au niveau du réticulum endoplasmique rugueux (**Figure 11, voies A-H**). Elles sont ensuite adressées à la lumière du réticulum endoplasmique par le peptide signal contenu dans la pré-région, qui va être clivé par des enzymes spécifiques, les « signal peptidases » (pour revue : Brix *et al.*, 2008). Après repliement correct, les procathepsines sont transportées au niveau de l'appareil de Golgi (**voie A**) pour y subir des modifications post-traductionnelles, telles que la formation des ponts disulfures, des glycosylations et des phosphorylations du mannose. Puis elles sont véhiculées via le récepteur du mannose-6-phosphate vers les endosomes/lysosomes tardifs (**voies B/C**), où va se dérouler l'étape de maturation (décrit précédemment, Chapitre 3.1.2.2).

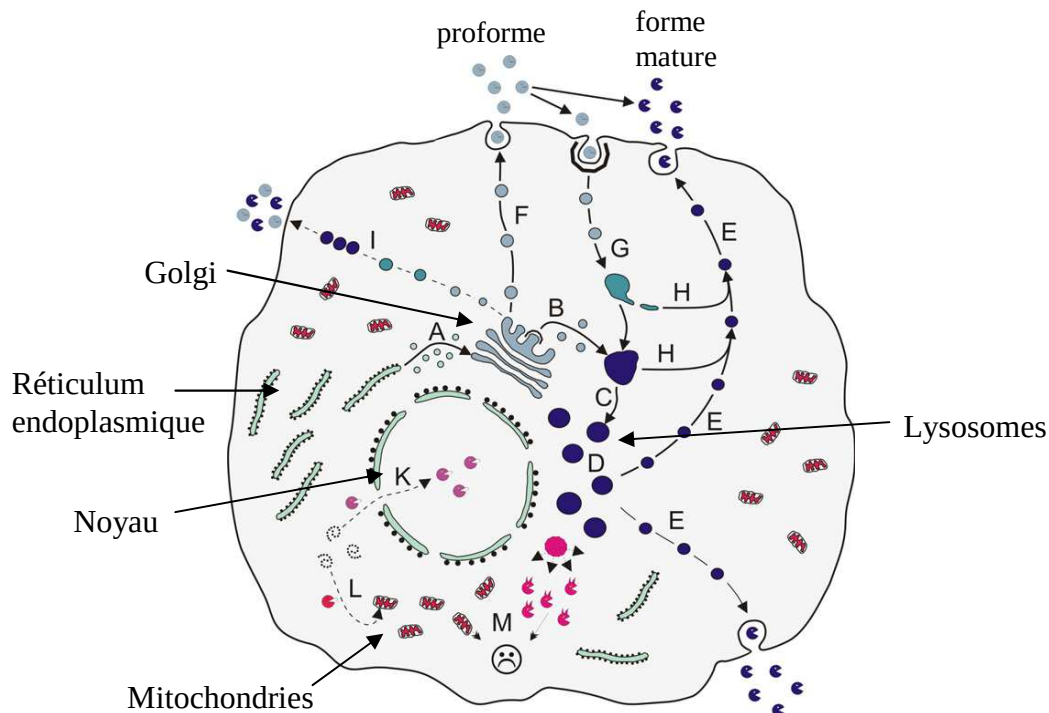


Figure 11 : Voies d'adressage des cathepsines à cystéine.
(d'après Brix *et al.*, 2008)

3.1.3.2. Voies alternatives

Dans certains types cellulaires, comme c'est le cas pour les thyrocytes et les kératinocytes, les cathepsines, proformes ou matures, peuvent également être sécrétées dans le milieu extracellulaire par exocytose (**voies E/F**) (Linke *et al.*, 2002 ; Büth *et al.*, 2004). Parfois, les

cathepsines qui sont sécrétées peuvent s'associer à la membrane plasmique des cellules. En effet, la cathepsine B a été localisée au niveau de microdomaines membranaires spécifiques, les cavéoles, où elle peut interagir avec l'annexine II, notamment lors de phénomènes cancéreux (Mai *et al.*, 2000). La procathepsine X, lorsqu'elle est sécrétée peut également interagir avec la surface des cellules, via une séquence RGD de reconnaissance aux intégrines qu'elle contient au niveau de sa prorégion (Lechner *et al.*, 2006). En parallèle, des proformes ayant été sécrétées peuvent être ré-internalisées (**voie G**). Certaines cathepsines, tronquées en N-terminal suite à de l'épissage alternatif, ne possèdent pas de peptide signal et peuvent atteindre des localisations inhabituelles comme le noyau (**voie K**) ou les mitochondries (**voie L**). Elles vont y exercer des fonctions plus spécifiques, telles que l'initiation de l'apoptose ou la régulation du cycle cellulaire. C'est notamment le cas de la cathepsine L, qui a été localisée dans le noyau sous forme mature, où elle activerait le facteur de transcription CDP/Cux, accélérant le passage en phase S du cycle cellulaire (Goulet *et al.*, 2004). La stéfine B, un inhibiteur endogène spécifique des cathepsines à cystéine, également présent dans le noyau, permettrait de réguler l'activité protéolytique de la cathepsine L (Ceru *et al.*, 2010). De plus, la cathepsine L est capable de cliver l'extrémité N-terminale de l'histone H3 chez la souris, ce qui permettrait de réguler la différenciation cellulaire et la progression du cycle cellulaire (Duncan *et al.*, 2008 ; Adams-Cioaba *et al.*, 2011). Enfin, dans certaines conditions pathologiques, les lysosomes peuvent relarguer les cathepsines dans le cytosol (**voie M**) où elles pourraient participer à la mort programmée de la cellule. Ainsi, en plus de leur fonction première de dégradation et de recyclage des protéines au sein des lysosomes, les cathepsines à cystéine peuvent être localisées dans de nombreux autres sites et donc intervenir dans des processus spécifiques.

3.2. Régulation des cathepsines à cystéine

Les cathepsines à cystéine ont une durée de demi-vie allant de quelques minutes à quelques heures selon la cathepsine et l'environnement cellulaire dans lequel elle se trouve (Nissler *et al.*, 1999 ; Katunuma, 2010). L'activité protéolytique de ces enzymes, en plus d'être régulée au niveau transcriptionnel, peut être régulée de façon réversible ou irréversible par de nombreux facteurs tels que le pH, la température, la présence de glycosaminoglycanes, d'espèces réactives de l'oxygène ou de leurs inhibiteurs endogènes.

3.2.1. Régulation transcriptionnelle

L'étude de la structure du promoteur de la cathepsine B montre qu'il possède les caractéristiques d'un gène de « ménage » exprimé de façon constitutive (riche en séquences GC), en adéquation avec la distribution ubiquitaire de la cathepsine B (Gong *et al.*, 1993). Au contraire, les promoteurs des cathepsines K et S ont un contenu en séquences GC plus faible, et ils contiennent de nombreux sites de liaisons à des facteurs de transcription, ce qui est caractéristique des promoteurs de protéines fortement régulées (Shi *et al.*, 1994). En effet, l'initiation de la transcription des cathepsines est régulée par la fixation au niveau de leur promoteur de nombreux éléments régulateurs tels que AP-1, AP-2, AP-3, IRF-1 (*IFN regulatory factor*), Sp1 (*Specificity protein*), Sp3, Ets1 et NF-Y (Troen *et al.*, 1991 ; Yan *et al.*, 2000 ; Jean *et al.*, 2002 ; Lecaille *et al.*, 2008). La fixation de ces éléments régulateurs résulte de cascades de signalisation mises en place en réponse à des cytokines ou facteurs de croissance. Ainsi, l'IFN- γ stimule l'expression des cathepsines B, K et L par des macrophages, et celle de la cathepsine S au niveau de cellules épithéliales, dont les kératinocytes, via les voies de signalisation JAK (*janus kinase*)/STAT (*signal transducers and activators of transcription*) et NF κ B (Li & Bever, 1996 ; Schwarz *et al.*, 2002 ; Storm van's Gravesande *et al.*, 2002). Au contraire, l'interleukine IL-10 régule négativement l'expression de la cathepsine S dans des macrophages et par conséquent inhibe la présentation antigénique (Chan *et al.*, 2010). De plus, la sécrétion de cathepsine L par des fibroblastes est fortement induite en présence de facteurs de croissance comme le FGF (Lemaire *et al.*, 1997 ; Ishidoh & Kominami, 1998). L'expression de la cathepsine K est quant à elle induite dans les ostéoclastes suite à l'activation de la voie RANK (*receptor activator of NF κ B*)/RANKL (*RANK ligand*) par le TNF- α (Troen, 2006).

3.2.2. Régulation par le pH

Les cathepsines à cystéine requièrent pour leur activité et leur stabilité une température de 37 °C, et un pH acide correspondant au pH des compartiments endosomaux et lysosomaux (pH 4-6). La plupart des cathepsines sont rapidement inactivées à pH neutre, à l'exception de la cathepsine S dont l'activité persiste au-delà d'une heure (Shi *et al.*, 1992 ; Kirschke *et al.*, 1989) et des cathepsines K et V dans une moindre mesure (Brömme *et al.*, 1996a ; Brömme *et al.*, 1999). Les cathepsines B et L quant à elles sont particulièrement instables à pH neutre du fait d'une inactivation irréversible de l'enzyme (Turk *et al.*, 1995). Cependant il existe certains mécanismes qui permettent soit de stabiliser les cathepsines à pH neutre, soit d'acidifier localement le milieu. Par exemple, la force ionique peut avoir un impact sur l'activité des cathepsines puisqu'il a été montré que la cathepsine L est stable à pH neutre dans des milieux salins tels que la solution saline de Hank (*Hank's balanced salt solution*, ou HBSS, pH 7,4), qui est considérée comme un modèle pertinent de fluide extracellulaire (Dehrmann *et al.*, 1996). De plus, en interagissant avec certaines molécules, comme leurs inhibiteurs naturels, les cathepsines peuvent être protégées d'une dénaturation à pH neutre, ce qui n'est pas sans rappeler l'effet protecteur de la prorégion avant la maturation. En parallèle, il existe des mécanismes qui vont acidifier le milieu, et ainsi permettre l'activité des cathepsines en dehors des lysosomes. Cela fait intervenir notamment des vacuoles de type H⁺-ATPase, qui vont pomper les protons du cytoplasme vers le milieu extracellulaire, comme cela a été montré dans des macrophages (Punturieri *et al.*, 2000). Dans cette étude, les cathepsines K, L et S, qui sont sécrétées par les macrophages, sont alors capables de dégrader l'élastine dans le milieu extracellulaire. De même, le milieu environnant les cellules tumorales est connu pour être acidifié par la présence de certains canaux ioniques, tels que les canaux sodiques, ce qui favorise l'activité protéolytique des cathepsines (Gillet *et al.*, 2009).

3.2.3. Régulation par le stress oxydatif

Les cathepsines à cystéine peuvent parfois être confrontées à de nombreuses espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, qui vont moduler leur activité protéolytique à la fois en conditions physiologiques et pathologiques. En effet, les protéases à cystéine sont sensibles aux agents oxydants, et plus particulièrement le thiol (-SH) de la cystéine Cys25 du site actif (Ascenzi *et al.*, 2001). Ainsi, l'oxygène singulet ¹O₂ inactive de façon irréversible les cathepsines B, L et S, puisqu'en sa présence leurs activités enzymatiques vis-à-vis de substrats fluorogéniques

spécifiques diminuent fortement, et ne sont pas restaurées en présence d'un agent réducteur, le dithiotréitol (DTT) (Nagaoka *et al.*, 2005). De plus, le peroxyde d'hydrogène H₂O₂, impliqué dans les phénomènes de stress oxydatif, est capable d'empêcher l'automaturation de la procathepsine K et d'inactiver sa forme mature (Godat *et al.*, 2008). La cystéine du site actif de la cathepsine K se retrouve dans 2/3 des cas sous la forme d'un acide sulfonique (-SO₂OH), ce qui inactive l'enzyme de façon irréversible, et dans 1/3 des cas sous la forme d'un acide sulfénique (-SOH), processus qui, lui, est réversible, notamment après addition de DTT. Le même processus conduisant à l'inactivation de la cathepsine K a également été observé en présence d'oxyde nitrique (NO) (Percival *et al.*, 1999). En parallèle, il a été montré que la catalase joue un rôle protecteur de l'activité des cathepsines à cystéine dans le milieu extracellulaire, en condition de stress oxydatif (Hervé-Grépinet *et al.*, 2008). Ces différents mécanismes expliquent en partie pourquoi l'activité protéolytique des cathepsines à cystéine est maintenue durant les phénomènes inflammatoires.

3.2.4. Régulation par les glycosaminoglycanes

Les cathepsines possèdent dans leur structure des résidus chargés positivement (arginine et lysine) et des résidus chargés négativement (acide aspartique et acide glutamique) (**Figure 12**). Le point isoélectrique (pI) diffère d'une cathepsine à l'autre, allant de 4,8 à 9,8 (**Tableau 6**), et selon le pH elles seront alors neutres, chargées positivement ou négativement (charge globale). Lorsqu'à leur pH optimum d'activité (pH 4-6) les cathepsines K, S et V sont chargées positivement (pI 7-9), les cathepsines B et L sont quant à elles neutres voire négatives (pI d'environ 5). Ainsi, de nombreux GAG sulfatés chargés négativement, incluant l'héparine, l'héparane sulfate et les chondroïtines sulfates, peuvent interagir avec les cathepsines chargées positivement, et réguler leur stabilité et leur activité (pour revue : Tersariol *et al.*, 2002).

De nombreuses études montrent que les GAG permettent de faciliter l'automaturation de plusieurs cathepsines à pH acide. Par exemple, l'automaturation des cathepsines B et L s'effectue plus rapidement en présence de dextran sulfate (Mason & Massey, 1992 ; Ishidoh & Kominami, 1994 ; Rozman *et al.*, 1999). De la même façon, l'automaturation de la cathepsine S est facilitée en présence de dextran sulfate et de faibles concentrations en chondroïtine sulfate (Kopitar *et al.*, 1996 ; Vasiljeva *et al.*, 2005). Comme montré pour la cathepsine B, il est probable que les GAG interagissent avec la prorégion des cathepsines, perturbant ainsi les interactions électrostatiques entre la prorégion et le domaine catalytique.

Cela induirait un changement de conformation de la prorégion qui ne recouvrirait plus le site actif, permettant à la cathepsine de cliver sa prorégion et de s'en libérer (Caglic *et al.*, 2007).

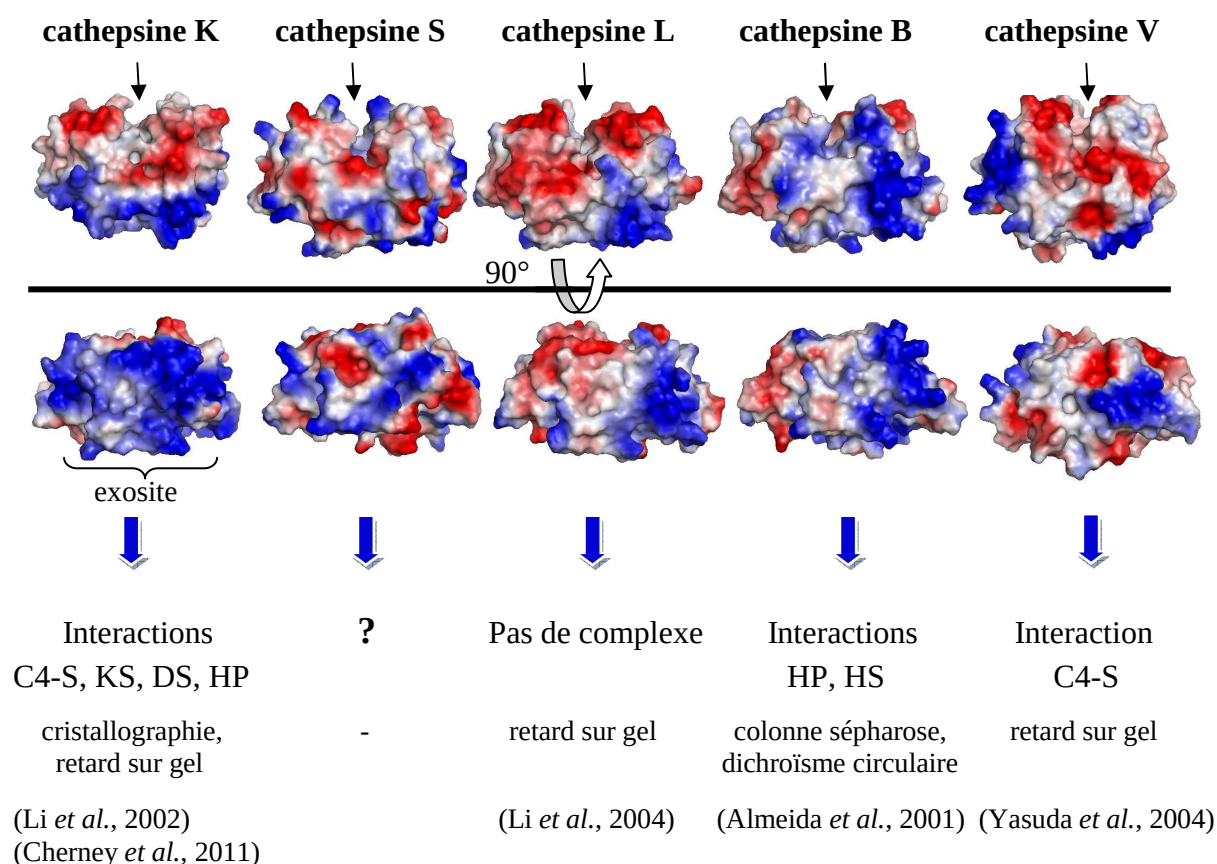


Figure 12 : Potentiel de surface des cathepsines K, S, L, B et V.

Les régions chargées positivement, riches en résidus basiques sont représentées en bleu, et les régions formées de résidus chargés négativement en rouge (Lecaille, collection personnelle). Le site actif est indiqué par une flèche (→).

Les GAG peuvent également réguler l'activité des cathepsines B, K et X, notamment à pH neutre. Ainsi l'héparane sulfate et l'héparine augmentent l'activité et la stabilité de la cathepsine B à pH 7,4 (Almeida *et al.*, 2001). Des analyses en dichroïsme circulaire montrent en effet que la structure secondaire de la cathepsine B n'est pas perturbée à pH neutre grâce à la présence d'héparine. L'effet est inverse pour la cathepsine X, dont l'activité est diminuée en présence d'héparine (Nascimento *et al.*, 2005). De plus, le chondroïtine 4-sulfate permet à la cathepsine K de rester active à pH neutre (Li *et al.*, 2000). Les GAG peuvent également modifier l'activité protéolytique des cathepsines vis-à-vis de substrats moléculaires. En effet, l'activité collagénolytique de la cathepsine K vis-à-vis des collagènes insolubles de type I et II est dépendante de la présence de C4-S. Celui-ci permet de former un complexe multimérique unique avec la cathepsine K via des interactions électrostatiques impliquant des exosites

localisés en dehors du site catalytique de l'enzyme (Li *et al.*, 2002 ; Li *et al.*, 2004). Les activités élastinolytiques des cathepsines K et V seraient à l'inverse inhibées en présence d'héparine et des chondroïtines sulfates (Yasuda *et al.*, 2004). De plus, les GAG présents dans les lysosomes, notamment les chondroïtines sulfates, inhiberaient l'activité des enzymes lysosomales (Avila & Convit, 1975).

3.2.5. Inhibiteurs endogènes spécifiques : superfamille des cystatines

L'activité protéolytique des cathepsines à cystéine est contrôlée par des inhibiteurs endogènes spécifiques, appartenant à la superfamille des cystatines (**Tableau 7**). Ce sont des inhibiteurs compétitifs et réversibles, partageant d'importantes similarités structurales et fonctionnelles. Cette superfamille se décline en 3 familles selon leur homologie de séquence : les stéfine (type 1), les cystatines (type 2) et les kininogènes (type 3) (Barrett *et al.*, 1986). En plus de cette classification par « types », une classification des inhibiteurs en clan et famille comme pour les protéases est également disponible sur la base de données MEROPS (Rawlings *et al.*, 2012) ; les inhibiteurs appartenant à la superfamille des cystatines étant regroupés dans le clan IH, famille I25.

Tableau 7 : Valeurs des constantes d'inhibition (K_i) des inhibiteurs endogènes des cathepsines à cystéine.

n.d. : K_i non déterminé ; i.a. : inhibition apparente (d'après Barrett *et al.*, 1986 ; Abrahamson, 1994 ; Turk *et al.*, 1996 ; Lecaille *et al.*, 2008 ; Turk *et al.*, 2012).

K_i (nM)	Cystatines				Thyropines			Serpines	
	Stéfine A	Stéfine B	Cystatine C	Kininogène (LMWK)	Saxiphiline	Equistatine	p41	SCCA1	Hurpine
CatS	0,05	0,07	0,008	n.d.	n.d.	0,4	>100	<0,1	pas d'inhibition
CatK	n.d.	0,012	0,004	0,005	n.d.	n.d.	0,09	i.a., n.d.	n.d.
CatH	0,31	0,58	0,28	0,72	n.d.	n.d.	5,3	n.d.	pas d'inhibition
CatL	1,3	0,23	0,005	0,017	0,02	0,051	0,002	0,064	n.d.
CatV	n.d.	n.d.	0,02	n.d.	n.d.	n.d.	0,007	n.d.	n.d.
CatB	8,2	73	0,25	600	1,67	1,4	>100	pas d'inhibition	pas d'inhibition

3.2.5.1. Les stéfinines

Les stéfinines sont des protéines simples structurellement, composées d'une chaîne polypeptidique d'environ 11 kDa, sans ponts disulfures, ni sites de glycosylation. Les stéfinines sont principalement intracellulaires, distribuées largement dans les tissus notamment les épithélia. On les retrouve également dans les fluides biologiques (Abrahamson *et al.*, 1986). Chez l'homme, il existe deux stéfinines : les stéfinines A et B, également nommées cystatines A et B. La stéfine A est fortement exprimée dans les cellules épithéliales de la peau, où elle est colocalisée avec les cathepsines, notamment la cathepsine L (Palungwachira *et al.*, 2002). Elle prendrait part à la fonction barrière de la peau en protégeant l'organisme contre les protéases à cystéine de pathogènes (Henskens *et al.*, 1996). La stéfine B, quant à elle, a une expression plus ubiquitaire, et sa localisation cytosolique permettrait de protéger la cellule de la protéolyse non contrôlée des cathepsines extralysosomales.

3.2.5.2. Les cystatines

Les cystatines contiennent environ 115 résidus (13-14 kDa), possèdent deux ponts disulfures et sont des inhibiteurs extracellulaires (pour revue : Turk & Bode, 1991). L'homme en possède huit : les cystatines C, D, F, G, M/E, S, SA et SN. La cystatine C est présente dans de nombreux fluides extracellulaires, alors que les cystatines D, S, SA et SN sont principalement exprimées dans la salive, dans des concentrations de l'ordre du micromolaire (Abrahamson *et al.*, 2003). La cystatine M/E est quant à elle retrouvée dans l'épiderme où elle aurait comme la stéfine A un rôle important dans la fonction barrière de la peau, notamment contre les protéases à cystéine de pathogènes, ainsi que dans le mécanisme de différenciation épidermique (Zeeuwen *et al.*, 2009).

3.2.5.3. Les kininogènes

Les kininogènes, connus depuis longtemps comme étant les précurseurs de kinines vaso-actives, sont des protéines plasmatiques circulantes, plus complexes structurellement puisqu'elles comportent cinq à six domaines dont deux domaines inhibiteurs de type cystatine. Il existe chez l'homme deux types de kininogènes : le kininogène de haut poids moléculaire (ou *high molecular weight kininogen*, HMWK) d'environ 120 kDa, et le kininogène de faible poids moléculaire (ou *low molecular weight kininogen*, LMWK) de 68 kDa (Salvesen *et al.*, 1986). Il existe un troisième type de kininogène, uniquement présent chez le rat, le T-kininogène (Esnard & Gauthier, 1983). Les kininogènes sont de très bons inhibiteurs des cathepsines à cystéine (K_i de l'ordre du picomolaire), à l'exception de la

cathepsine B qui, en plus d'être mal inhibée à cause de la présence de la boucle d'occlusion (K_i de l'ordre du micromolaire), serait capable de cliver les kininogènes en conditions physiopathologiques (Naudin *et al.*, 2010). En plus d'inhiber les cathepsines et d'être les précurseurs des kinines, de nouvelles fonctions des kininogènes ont été récemment découvertes (pour revue : Lalmanach *et al.*, 2010). En effet, un fragment libéré par clivage protéolytique de HMWK, nommé HKa, possède des propriétés anti-angiogéniques et pro-apoptotiques (Colman *et al.*, 2000 ; Zhang *et al.*, 2000). De plus, certains peptides dérivés de HMWK se révèlent être des peptides antimicrobiens à large spectre, parfois aussi efficaces que la cathélicidine LL-37 (Frick *et al.*, 2006). Enfin, le T-kininogène est un biomarqueur du vieillissement chez le rat, ses expressions géniques et protéiques étant fortement augmentées chez des rats âgés (Sierra *et al.*, 1989). Chez l'homme, qui ne possède pas de T-kininogène, il semblerait que la concentration plasmatique en HMWK augmente avec l'âge (Kleniewski & Czokalo, 1991).

3.2.5.4. Interaction cystatines/protéases à cystéine

Les cystatines inhibent les cathepsines en formant un complexe stable mais réversible, selon une stœchiométrie enzyme : inhibiteur 1:1, tandis que les kininogènes peuvent inhiber deux protéases indépendamment (Turk *et al.*, 1996). C'est grâce à des analyses de structures tridimensionnelles de la cystatine du poulet et de la stéfine B humaine complexées à la papaïne que le mécanisme général d'inhibition a été mis en évidence (Bode *et al.*, 1988 ; Stubbs *et al.*, 1990). Celui-ci fait intervenir trois régions hautement conservées (pour revue : Bode & Huber, 1992) (**Figure 13**) : une région située en N-terminal contenant une séquence consensus LVG dans laquelle la glycine est invariante (Abrahamson *et al.*, 1987) ; une partie centrale présentant le motif QVVAG, qui stabilise le complexe enzyme-inhibiteur (Bode *et al.*, 1990) ; et une région en C-terminal qui contient le doublet PW (Björk & Ylinenjärvi, 1990). La région LVG interagit au niveau du site actif et des sous-sites S1-S3 de l'enzyme, tandis que les régions QVVAG et PW se lient aux sous-sites S1' et S2' (Otto & Schirmeister, 1997).



Figure 13 : 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).

3.2.6. Autres inhibiteurs endogènes non spécifiques

3.2.6.1. α -2 macroglobuline

L' α -2 macroglobuline est une protéine plasmatique constituée de quatre sous-unités de 185 kDa (Hudson & Koo, 1982). Elle est capable d'inhiber irréversiblement et de manière non spécifique des membres appartenant à toutes les classes de protéases, notamment en les piégeant au sein de sa structure tétramérique (Barrett & Starkey, 1973). L'interaction inhibiteur-enzyme induit un changement de conformation de l' α -2 macroglobuline, qui va alors interagir avec des récepteurs à la surface des macrophages, conduisant à l'élimination du complexe par endocytose (Kaplan & Nielsen, 1979).

3.2.6.2. Les thyropines

Les membres de la famille de la thyropine (pour *thyroglobulin type-1 domain proteinase inhibitors*) possèdent dans leur séquence un motif conservé, riche en cystéine, issu du domaine de type 1 de la thyroglobuline humaine (Lenarcic & Turk, 1999). Il a été montré que certaines thyropines présentent des activités inhibitrices vis-à-vis des cathepsines à cystéine (**Tableau 7**), telles que la saxiphiline retrouvée chez la grenouille (Lenarcic *et al.*, 2000), l'équistatine présente chez l'anémone de mer (Lenarcic *et al.*, 1997) et le fragment p41, un dérivé de la chaîne invariante Ii du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (Bevec *et al.*, 1997). Il est intéressant de noter que le nidogène possède également un domaine de type

thyroglobuline, en amont de son domaine G3. Cependant, le nidogène n'est pas capable d'inhiber la papaine (Yamashita & Konagaya, 1996). En effet, bien que possédant des domaines de type thyroglobuline, certaines protéines se révèlent au contraire être de bons substrats pour les cathepsines à cystéine (Pungercic *et al.*, 2002). C'est par ailleurs le cas de la thyroglobuline, qui peut être clivée par les cathepsines B, K et L (Dunn *et al.*, 1991 ; Friedrichs *et al.*, 2003).

3.2.6.3. Les serpins

Comme leur nom l'indique, les serpins (pour *serine proteinase inhibitors*) sont des inhibiteurs des protéases à sérine (**Tableau 7**). Cependant, certaines serpins sont également capables d'inhiber d'autres classes de protéases dont les cathepsines à cystéine. En effet, la protéine SCCA1 (pour *squamous cell carcinoma antigen 1*) ou serpine B3 est un inhibiteur des cathepsines K, L et S (Schick *et al.*, 1998). L'hurpine, également dénommée serpine B13, inhibe quant à elle les cathepsines K, L et V, et protégerait les kératinocytes de l'apoptose induite par les cathepsines à cystéine suite à une irradiation UV (Welss *et al.*, 2003).

3.2.7. Inhibiteurs synthétiques

Au départ considérés comme des outils permettant une meilleure compréhension des mécanismes régissant l'activité protéolytique, les inhibiteurs de protéases sont désormais étudiés dans le cadre de traitements thérapeutiques efficaces. Les inhibiteurs des cathepsines comprennent des peptides réversibles dérivés d'aldéhydes ou de nitriles, et des peptides irréversibles tels que les diazométhanes, dérivés époxy ou encore des vinyl-sulfones.

3.2.7.1. Inhibiteurs réversibles

Les premiers inhibiteurs réversibles décrits sont les peptides aldéhydes, issus de souches de *Streptomyces*, comme la leupeptine et l'antipaine, peu sélectifs des cathepsines à cystéine (Rich *et al.*, 1986). D'autres inhibiteurs analogues ont ensuite été développés afin d'améliorer leur sélectivité (Shaw, 1990). En plus de ces peptides aldéhydes, il existe d'autres types d'inhibiteurs réversibles : 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 (Hu & Abeles, 1990 ; Krantz, 1994 ; Brömme *et al.*, 1994). Des dérivés de nitriles et de cyanamides, non peptidiques, inhibent efficacement et de façon réversible les cathepsines à cystéine (Falgueyret *et al.*, 2001).

3.2.7.2. Inhibiteurs irréversibles

Les peptidyl-chloro-méthyl cétones sont les premiers inhibiteurs irréversibles à avoir été synthétisés (Shaw, 1990). Cependant, étant très réactifs, ils inhibent également les protéases à sérine, et interagissent avec des molécules possédant un groupement thiol -SH comme le glutathion. La substitution du groupement chlore par un groupement fluore, donnant lieu à des inhibiteurs de type fluoro-méthyl cétone, a permis d'obtenir une sélectivité satisfaisante vis-à-vis des cathepsines à cystéine (Harth *et al.*, 1993 ; Shaw, 1990).

Parallèlement au développement de ces inhibiteurs synthétiques, un inhibiteur a pu être isolé à partir d'un extrait du champignon *Aspergillus japonicus* : le L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane, ou E-64 (Barrett *et al.*, 1981). C'est un inhibiteur irréversible, inhibant spécifiquement les protéases à cystéine par alkylation de la cystéine du site actif (**Figure 14**). Il agit de façon dose-dépendante et sert d'agent titrant des protéases de la famille de la papaïne (Barrett *et al.*, 1982). Le mécanisme d'inhibition fait intervenir les sous-sites, S1 interagissant avec le résidu époxy de l'E-64, tandis que le sous-site S2 accommode le résidu leucine. À partir de cet inhibiteur ont été développés des dérivés spécifiques de la cathepsine B, comme les CA-030 et CA-074 (Sumiya *et al.*, 1992), ainsi que les CLIK (pour *cathepsin L inhibitors Katunuma*) qui inhibent la cathepsine L (Katunuma *et al.*, 1999).

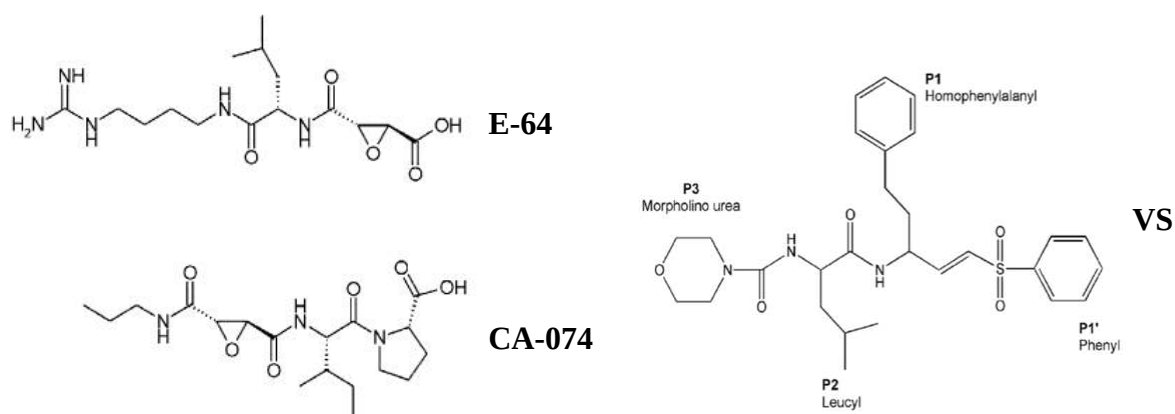


Figure 14 : Structure des principaux inhibiteurs synthétiques des cathepsines à cystéine. L'E-64 (L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane) est un inhibiteur général des cathepsines à cystéine, tandis que le CA-074 (N-(L-3-trans-propylcarbomoyl-oxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline) inhibe spécifiquement la cathepsine B, et le VS (morpholine urea-Leu-homophénylalanine-(vinylsulfonyl)benzène) inhibe spécifiquement la cathepsine S (d'après Stern *et al.*, 2004).

Ces inhibiteurs sont certes de bons outils biochimiques, mais ne pourraient pas être utilisés *in vivo* car ils sont toxiques pour les organismes. Une nouvelle classe d'inhibiteurs, les vinyl-sulfones, semblent cependant prometteurs (Palmer *et al.*, 1995). En effet, ils ne présentent pas d'effets nocifs apparents et sont très sélectifs (Brömme *et al.*, 1996b). Leur mécanisme d'inhibition consiste à se positionner 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). Cependant ces inhibiteurs, du fait de leur irréversibilité, ne pourraient pas être utilisés pour le traitement de maladies chroniques (ex : ostéoporose), mais seraient plutôt préconisés pour des traitements ponctuels, notamment vis-à-vis des protéases à cystéine d'origine parasitaire.

3.2.7.3. Inhibiteurs en cours d'essais cliniques

La découverte de l'implication de certaines cathepsines à cystéine dans diverses pathologies a conduit les industries pharmaceutiques à les considérer comme des cibles thérapeutiques d'intérêt. La stratégie principale est d'utiliser des inhibiteurs ciblant ces enzymes au niveau de leur site actif. Idéalement, ces inhibiteurs doivent être de petites tailles, avec une partie peptidique courte afin d'éviter des réactions immunitaires, se lier de façon réversible au site actif et être fortement sélectif de la cathepsine ciblée (l'affinité doit être 100 fois supérieure à celle obtenue pour les autres enzymes). De plus, ils doivent répondre aux critères pharmacologiques standards de forte biodisponibilité, faible toxicité, temps de demi-vie important et constante d'élimination faible ; que ce soit dans le cadre de traitements ponctuels ou chroniques (Brömme & Lecaille, 2009).

À l'heure actuelle seulement deux cathepsines à cystéine sont validées comme cibles thérapeutiques (**Tableau 8**) : la cathepsine K, majoritairement pour traiter l'ostéoporose, et la cathepsine S pour des affections immunitaires comme l'asthme, le psoriasis et l'arthrite rhumatoïde (Palermo & Joyce, 2008). Depuis 2004, plus de 50 demandes de brevets ont été déposées concernant des inhibiteurs de cathepsine K, dont le plus prometteur, l'Odanacatib de chez Merck, est entré en phase d'essai clinique III en 2009 (Wijkmans & Gossen, 2011). Bien que plus de 40 demandes de brevets pour des inhibiteurs de cathepsine S aient été également déposés durant cette période, les recherches sur cette enzyme ont ralenti au profit d'autres cathepsines (Lee-Dutra *et al.*, 2011). Enfin, la cathepsine B est également l'objet d'études, puisque des inhibiteurs la ciblant ont été développés dans le cadre de traitements de cancers et de la maladie d'Alzheimer, pour laquelle la cathepsine B semble être une cible prometteuse. Cependant aucun inhibiteur de la cathepsine B n'a dépassé à ce jour le stade des essais précliniques (Gupta *et al.*, 2008).

Tableau 8 : Inhibiteurs thérapeutiques de cathepsines à cystéine en cours de développement clinique.

(d'après Palermo & Joyce, 2008 ; Gupta *et al.*, 2008 ; Wijkmans & Gossen, 2011 ; Lee-Dutra *et al.*, 2011)

	Molécule	Indication	Phase clinique	Compagnie pharmaceutique
Cathepsine K	MK-0822 (Odanacatib)	Cancer du sein, ostéoporose	Phase III	Merck
	ONO-5334	Ostéoporose	Phase II	Ono Pharmaceutical
	AAE-581 (Balicatib)	Ostéoporose	Arrêté en phase II	Novartis
	CRA-013783	Ostéoporose	Phase I	Merck/Celera
	MIV-701	Maladies osseuses	Arrêté en phase I	Medivir
	GSK462795 (Relacatib)	Ostéoporose, ostéoarthrite, métastase osseuse	Arrêté en phase I	GlaxoSmithKline
	AFG-495	Ostéoporose	Arrêté en phase I	Novartis
	OST-4077	Maladies osseuses	Préclinique	Dong-A Research Laboratories
Cathepsine S	SB-553484	Ostéoporose, métastase osseuse	Préclinique	GlaxoSmithKline
	RWJ-445380	Arthrite rhumatoïde, psoriasis	Phase II	Johnson & Johnson
	CRA-028129	Psoriasis	Phase I	Schering AG
Cathepsine B	Non communiqué	Maladies auto-immunes	Préclinique	Medivir
	BDI-7800	Cancers	Préclinique	Biopharmacopae
	ALP-496	Maladie d'Alzheimer	Préclinique	American Life Science Pharmaceuticals

3.3. Fonctions physiologiques et pathologiques des cathepsines à cystéine

3.3.1. Fonctions physiologiques

En plus de leur rôle bien décrit de dégradation et de recyclage des protéines intracellulaires dans les compartiments lysosomaux (Barrett, 1992), les cathepsines à cystéine possèdent d'autres fonctions physiologiques 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 (pro-enzymes et prohormones), la présentation des antigènes par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, ainsi que dans le remodelage osseux et l'apoptose.

3.3.1.1. Activation de précurseurs protéiques

Les cathepsines à cystéine prennent part à la maturation de protéines variées. Les cathepsines B, K et L participent à la libération de la thyroxine (T₄), une hormone thyroïdienne, après protéolyse de la thyroglobuline (Brix *et al.*, 1996 ; Friedrichs *et al.*, 2003). La cathepsine H intervient dans la maturation de la protéine du surfactant pulmonaire SP-B (Guttentag *et al.*, 2003). De plus, les cathepsines B et C participent à la maturation de pro-enzymes. En effet, la cathepsine C active de nombreuses protéases à sérine telles que la cathepsine G, l'élastase, la protéase-3 et les granzymes A et B (Pham & Ley, 1999 ; Adkison *et al.*, 2002), et la cathepsine B mature la β -galactosidase (Okamura-Oho *et al.*, 1997), la rénine (Jutras & Reudelhuber, 1999) et la trypsine (Halangk *et al.*, 2000). En parallèle, les cathepsines sont également capables d'hydrolyser des inhibiteurs de protéases, ce qui, en conditions pathologiques, participe au déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases en faveur de la protéolyse. En effet, les cathepsines B, L et S sont capables de cliver le SLPI (pour *secretory leukoprotease inhibitor*), ce qui a pour effet d'inactiver son activité inhibitrice vis-à-vis des protéases à sérine (Taggart *et al.*, 2001). Les inhibiteurs de MMP, les TIMP, sont eux aussi susceptibles d'être dégradés par les cathepsines, notamment la cathepsine B qui inactive les TIMP-1 et -2 (Kostoulas *et al.*, 1999).

3.3.1.2. Présentation antigénique

Les cathepsines à cystéine sont impliquées dans les réponses du système immunitaire, à la fois par la formation des peptides antigéniques présentés et par la maturation des molécules du CMH de classe II (**Figure 15**). Des études de dégradation *in vitro* des antigènes ont montré que les cathepsines B, L et S participent à leur dégradation en peptides antigéniques, parallèlement à d'autres protéases lysosomales (cathepsine D, légumaine) (Katunuma *et al.*, 1998). Cependant, comme en témoignent des études de souris transgéniques déficientes en cathepsine B, son absence n'affecte pas le processus de présentation antigénique, ce qui suggère une redondance entre les cathepsines à cystéine pour cette fonction (Deussing *et al.*, 1998).

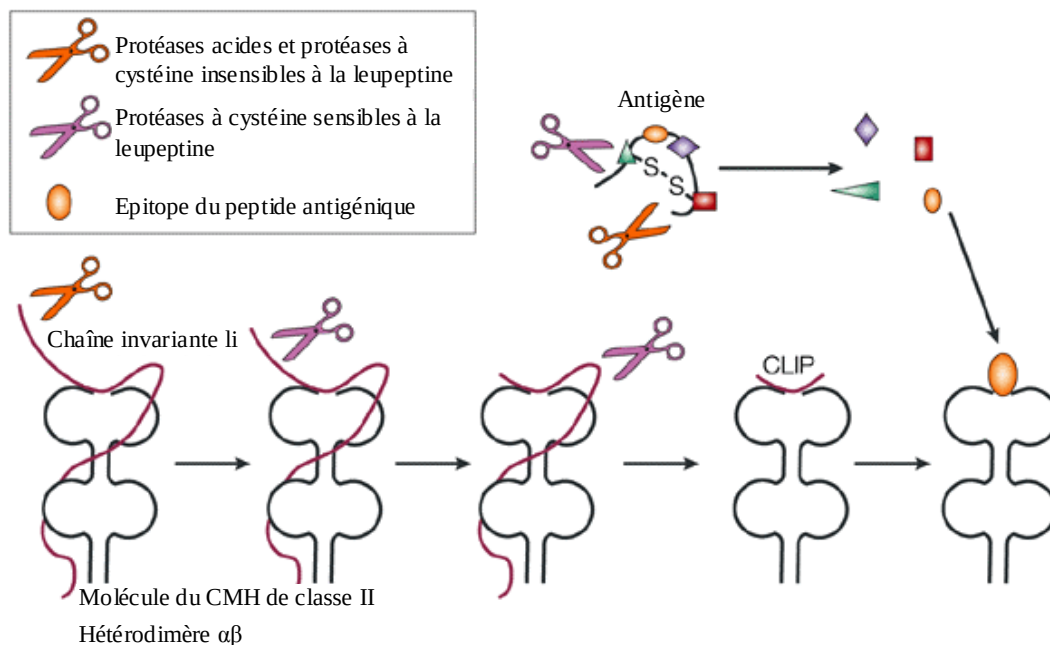


Figure 15 : Rôle des protéases à cystéine dans la présentation antigénique par le CMH de classe II.

Les cathepsines à cystéine sont impliquées tant au niveau de la maturation de la chaîne invariante Ii que dans la génération des peptides antigéniques (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, en se fixant aux molécules α et β du CMH de classe II permet de les stabiliser, de les diriger vers les compartiments endosomaux et empêche la fixation précoce de peptides antigéniques sur ces molécules. Cette chaîne Ii va subir plusieurs dégradations protéolytiques, jusqu'à la formation d'un peptide de 15 résidus appelé CLIP (pour *class II-associated invariant chain peptide*), qui

pourra par la suite être facilement libéré et remplacé par le peptide antigénique pour présentation à la surface de la cellule. Des études *in vitro* et *in vivo* montrent que les cathepsines interviennent dans les dernières étapes de dégradation de la chaîne Ii, conduisant à la formation du peptide CLIP. La cathepsine S semblerait être essentielle à la génération de la chaîne invariante, notamment en ce qui concerne le dernier clivage. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la cathepsine S de type vinyl-sulfone, le LHVS (morpholinourea-leucinyl-homophenylalanine-vinylsulfone-phenyl), prévient toute maturation de la chaîne Ii au niveau des lymphocytes B et des cellules dendritiques (Riese *et al.*, 1996). Par la suite, des études de souris déficientes en cathepsine S ont confirmé ces résultats, mais elles ont également montré que cette cathepsine ne serait pas responsable de la génération du peptide CLIP dans toutes les cellules présentatrices d'antigène (Nakagawa *et al.*, 1999). Ainsi, la cathepsine L interviendrait dans la maturation de CLIP au niveau des cellules épithéliales corticales du thymus chez la souris, tandis que chez l'homme il s'agirait de la cathepsine V (Nakagawa *et al.*, 1998 ; Tolosa *et al.*, 2003).

3.3.1.3. Angiogenèse

L'angiogenèse est décrite comme étant un processus conduisant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, à partir de vaisseaux pré-existants (Pandya *et al.*, 2006). Bien qu'associé à la croissance tumorale, c'est également un processus physiologique, qui est essentiel durant la réparation tissulaire et le développement embryonnaire. Le processus d'angiogenèse implique des protéases qui vont dégrader de façon contrôlée la membrane basale et la matrice extracellulaire pour permettre aux cellules endothéliales de pénétrer à travers et former ainsi de nouveaux vaisseaux. Parmi les différentes protéases impliquées, la cathepsine S a été identifiée comme étant l'une des candidates. En effet, des cellules endothéliales issues de souris déficientes en cathepsine S ont une capacité moins importante à dégrader de l'élastine et du collagène IV par rapport aux souris contrôles (Shi *et al.*, 2003). De plus, ces cellules montrent un potentiel invasif fortement réduit à travers un modèle de membrane basale extraite de la tumeur EHS.

3.3.1.4. Remodelage de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire et la membrane basale sont soumises à la protéolyse de manière contrôlée, lors de processus physiologiques tels que le remodelage ou la réparation tissulaire (pour revue : Page-McCaw *et al.*, 2007 ; Lu *et al.*, 2011). Bien que les MMP et les protéases à

sérine soient impliquées dans la dégradation et le remodelage matriciel, les cathepsines à cystéine participent également à ce processus.

Les premières études portant sur la dégradation des protéines de la membrane basale par les cathepsines à cystéine ont mis en évidence, par des techniques dites de biochimie « classique » (électrophorèse, immunodétection, gel filtration), que la cathepsine B est capable de dégrader le collagène IV, la laminine et la fibronectine (Buck *et al.*, 1992). Peu après, une équipe a confirmé ces résultats et montré que ces molécules sont également sensibles à la protéolyse par la cathepsine L (Guinec *et al.*, 1993). Au fur et à mesure de la découverte de nouveaux membres appartenant à la famille des cathepsines à cystéine, durant les années 1990, sont apparues des données concernant leur capacité à dégrader les constituants matriciels. La cathepsine H, qui est une aminopeptidase stricte donc ne clive qu'en N-terminal de son substrat, hydrolyse la fibronectine mais n'est pas capable de dégrader ni les collagènes solubles et insolubles, ni la laminine (Thomas & Davies, 1989 ; Tsushima *et al.*, 1991). La cathepsine K clive le collagène IV en plus des collagènes insolubles (Quintanilla-Dieck *et al.*, 2009). La cathepsine S, quant à elle, clive la laminine, la fibronectine, le collagène IV et le perlécan (Petanceska *et al.*, 1996 ; Liuzzo *et al.*, 1999 ; Burns-Kurtis *et al.*, 2004). De plus, des cellules endothéliales de souris déficientes en cathepsine S présentent un potentiel invasif à travers un modèle de membrane basale fortement réduit, car elles perdent une partie de leur capacité à dégrader les différents constituants (Shi *et al.*, 2003). Les cathepsines sont donc capables de cliver de nombreux substrats au sein de la membrane basale, mais jusqu'à présent aucune étude ne s'est intéressée à leur capacité à dégrader les nidogènes.

En plus des protéines de la membrane basale, les cathepsines à cystéine dégradent les protéines matricielles telles que les collagènes insolubles et l'élastine. Contrairement aux autres protéases, la cathepsine K est la seule capable de cliver les collagènes insolubles de type I (constituant majoritaire de l'os et présent dans la peau) et de type II (constituant majoritaire du cartilage) à de multiples endroits de la triple hélice, de la même manière que les collagénases bactériennes (Garnero *et al.*, 1998 ; Kafienah *et al.*, 1998). L'activité collagénolytique des cathepsines B et L se limite uniquement aux télépeptides non structurés (extrémités N- et C-terminales), tandis que les MMP clivent en un seul site de la triple hélice de collagène, générant des fragments correspondant aux 1/4 et 3/4 de la molécule. Il est intéressant de noter ici que la cathepsine K a la particularité parmi les cathepsines à cystéine d'accepter en S2 un résidu proline et en S3 un résidu glycine, ce qui lui permet d'hydrolyser spécifiquement des substrats de type Gly-Pro-Arg (Aibe *et al.*, 1996) ; motif que l'on retrouve

dans la séquence des collagènes. L'activité collagénolytique unique de la cathepsine K requiert des interactions sélectives entre ses exosites chargés positivement situés à l'opposé de son site actif (**Figure 12**) et des molécules de chondroïtine 4-sulfate chargées négativement (**Figure 16**) ; tandis que son activité gélatinolytique n'est pas dépendante de ces interactions (Selent *et al.*, 2007).

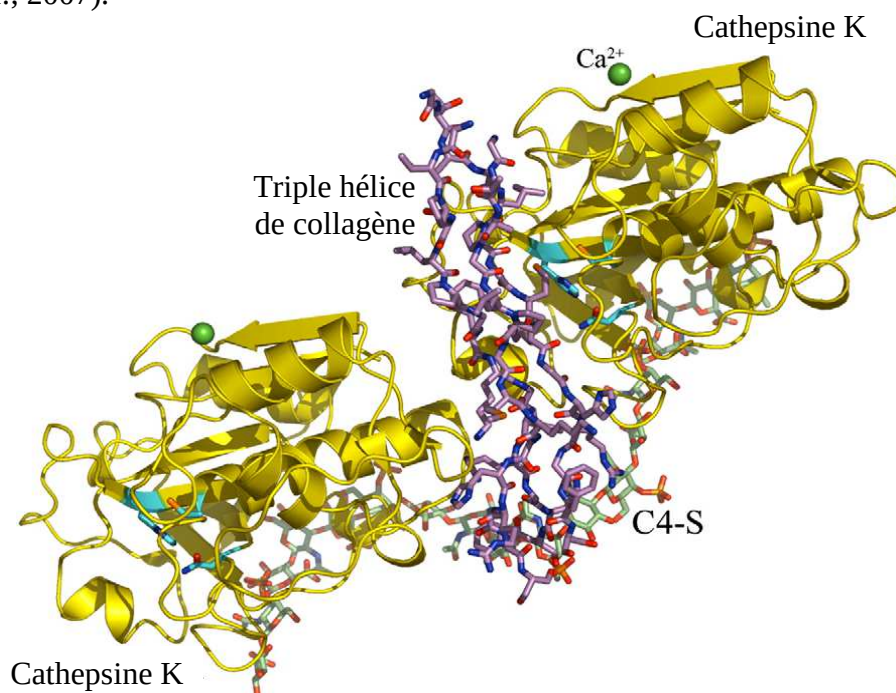


Figure 16 : Représentation du complexe cathepsine K/C4-S.

Le C4-S, en interagissant avec les exosites de la cathepsine K, permet la formation d'un complexe multimérique capable de cliver la triple hélice des collagènes I et II (d'après Li *et al.*, 2008).

Bien que l'élastine soit une protéine très résistante à la protéolyse (Vrhovski & Weiss, 1998), certaines cathepsines à cystéine humaines (les cathepsines B, F, K, L, S et V) ont la capacité de la dégrader. Ce sont même de très bonnes élastases, les cathepsines K et S étant *in vitro* plus efficaces que l'élastase de neutrophile ou que la métalloélastase de macrophages MMP-12 (Shi *et al.*, 1992 ; Chapman *et al.*, 1997). La cathepsine V, découverte plus récemment, a également un très fort potentiel élastinolytique (Yasuda *et al.*, 2004). Cette étude montre par ailleurs que les cathepsines K et S de macrophages seraient les principales cathepsines impliquées dans la dégradation extracellulaire de l'élastine, tandis que la cathepsine V interviendrait dans sa digestion intracellulaire au sein des compartiments lysosomaux.

De façon surprenante, Barry et Platt ont récemment décrit un nouveau mode de régulation de l'activité protéolytique des cathepsines à cystéine, qu'ils ont appelé « cannibalisme » (Barry

& Platt, 2012). En effet, ils montrent dans cette étude que la cathepsine S peut cliver la cathepsine K, ce qui a pour conséquence de réduire l'hydrolyse du collagène I et de l'élastine.

3.3.1.5. Apoptose

Bien que l'implication des cathepsines à cystéine dans les phénomènes d'apoptose ne soit pas encore totalement caractérisée, de nombreuses études tendent à démontrer leur rôle dans ce processus. Deux voies de signalisation aboutissent à l'apoptose : la voie extrinsèque, qui passe par des récepteurs membranaires (comme le récepteur au TNF- α), et la voie intrinsèque ou mitochondriale ; ces deux voies faisant intervenir des protéases à cystéine, les caspases (clan CD, famille C14) (pour revue : Salvesen, 2001). Par ailleurs, une perméabilisation des lysosomes est également associée à l'apoptose, ce qui conduit à la libération de cathepsines à cystéine, dont la cathepsine B. En effet, après induction de l'apoptose par le TNF- α dans des hépatocytes, la caspase 8 induirait une augmentation de la concentration en cathepsine B active dans le cytosol, permettant la libération du cytochrome c des mitochondries et aboutissant à l'apoptose (Guicciardi *et al.*, 2000). Ce phénomène est de plus fortement diminué chez des souris déficientes en cathepsine B (Guicciardi *et al.*, 2000). L'implication de la cathepsine B passerait par le clivage du facteur pro-apoptotique Bid, à l'origine du relargage mitochondrial du cytochrome c (Stoka *et al.*, 2001 ; Cirman *et al.*, 2004). En outre, la cathepsine C participerait à l'apoptose via l'activation de la granzyme B, qui à son tour peut activer la caspase 3 (Pham & Ley, 1999).

3.3.2. Fonctions physiopathologiques

Jusqu'à présent, deux maladies humaines ont été attribuées à des déficits en cathepsine : la pycnodysostose, causée par une déficience en cathepsine K et qui affecte le développement osseux ; et le syndrome de Papillon-Lefèvre, maladie touchant la peau et les gencives qui résulte d'une déficience en cathepsine C. Cependant, la plupart des pathologies dans lesquelles sont impliquées les cathepsines à cystéine ne sont pas dues à un déficit en cathepsine, mais plutôt à leur sur-expression, à une localisation inhabituelle ou à une activité protéolytique plus importante. En effet, bien que normalement finement régulées par les mécanismes décrits précédemment, un déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases en faveur de la protéolyse peut avoir lieu et conduire à des pathologies diverses et variées (pour revue : Berdowska, 2004).

3.3.2.1. Ostéoporose/Pycnodysostose

En conditions physiologiques, la cathepsine K intervient dans le remodelage du tissu osseux par les ostéoclastes. C'est la cathepsine majoritaire impliquée dans ce processus puisqu'elle représente 98 % de l'activité protéolytique totale des protéases à cystéine dans les ostéoclastes (Drake *et al.*, 1996). Les ostéoclastes sécrètent dans la lacune de résorption des protéases, comme des MMP et la cathepsine K, ainsi que des protons qui vont acidifier l'environnement ; conduisant à la résorption osseuse dite « acide ». Dans un premier temps il y a déminéralisation, puis les composants organiques tels que les fibres de collagène I, qui composent à 90 % les os (Brömme *et al.*, 1996a), sont dégradés par les enzymes. En plus des MMP, la cathepsine K prend part à ce processus de dégradation, notamment grâce à la présence de C4-S en abondance dans les os et le cartilage. L'inhibition de la résorption osseuse par des inhibiteurs spécifiques de la cathepsine K, de type vinyl-sulfone, confirme son implication dans ce processus (Xia *et al.*, 1999). De plus, des souris déficientes en cathepsine K présentent une mauvaise résorption osseuse, avec des ostéoclastes contenant des fibrilles de collagène I non digérées (Saftig *et al.*, 1998). L'ostéoporose est une pathologie qui résulte d'un déséquilibre entre formation et résorption osseuse. Une résorption osseuse trop excessive peut conduire à une fragilisation de la structure de la matrice osseuse qui sera alors plus sensible à des fractures. L'ostéoporose est un problème majeur de santé publique puisqu'elle toucherait actuellement 75 millions de personnes en Europe, Japon et Amérique du Nord selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Cette maladie affecte plus particulièrement les femmes du fait des changements hormonaux survenant à la ménopause.

Le rôle critique de la cathepsine K dans le remodelage osseux a été renforcé avec la découverte en 1996 que la pycnodysostose, maladie génétique affectant les os, est due à une mutation dans le gène codant pour la cathepsine K (Gelb *et al.*, 1996). La pycnodysostose est une maladie rare, dont la prévalence exacte est inconnue mais inférieure à 1/100 000, et qui est caractérisée par une petite taille voire un nanisme, une fragilité osseuse et une ostéosclérose du squelette. Au niveau microscopique, les patients atteints de cette maladie présentent des fibrilles de collagène non digérées dans leurs ostéoclastes, dû à la perte de l'activité collagénolytique de la cathepsine K (Everts *et al.*, 1985). Cette pathologie est souvent associée au peintre français Henri de Toulouse-Lautrec, qui était atteint d'une maladie osseuse présentant beaucoup de similitudes avec la pycnodysostose (Frey, 1995).

3.3.2.2. Arthrite rhumatoïde

L'arthrite rhumatoïde est une pathologie inflammatoire touchant les articulations, qui selon l'OMS concerne environ 1 % de la population mondiale et touche trois fois plus les femmes que les hommes. En plus de la composante inflammatoire, cette maladie se caractérise par une destruction progressive du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral, pouvant conduire à une perte de la fonction de l'articulation (pour revue : Lecaille *et al.*, 2002a). Le cartilage est composé d'un réseau élastique de fibres de collagène de type II et de molécules d'agrécanes lui permettant de résister à la compression (Kempson *et al.*, 1973). La dégradation protéolytique excessive de l'un ou l'autre de ces constituants conduit au phénomène arthritique (Kempson *et al.*, 1976). En plus des MMP qui peuvent participer à la dégradation du cartilage, il a été mis en évidence à l'aide d'inhibiteurs spécifiques que certaines cathepsines à cystéine (cathepsines B, K, L et S) sont impliquées dans ces pathologies (Esser *et al.*, 1994). En effet, les cathepsines sont exprimées par les fibroblastes synoviaux (Trabandt *et al.*, 1990 ; Trabandt *et al.*, 1991 ; Hou *et al.*, 2001), et leur expression est inductible par des facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α , le FGF, l'interleukine IL-1 ou encore l'interféron- γ (Hou *et al.*, 2002). Ces différentes cathepsines sont toutes capables de dégrader les agrégats d'agrécanes, ce sont donc des agrécanases (Nguyen *et al.*, 1990 ; Nguyen *et al.*, 1991), tandis que la cathepsine K, au côté des MMP, peut cliver le collagène de type II, là encore grâce aux GAG présents dans le cartilage. De plus, l'environnement extracellulaire est optimum pour l'activité protéolytique des cathepsines puisque le pH du cartilage est proche de 5 dans cette pathologie.

3.3.2.3. Athérosclérose

L'athérosclérose est la principale cause de mortalité dans les pays industrialisés (source OMS). C'est une maladie inflammatoire, caractérisée par un épaissement et une perte d'élasticité de la paroi artérielle, qui cause une réduction voire une obstruction du flux sanguin, pouvant conduire à des infarctus ou des anévrismes. L'obstruction des artères se fait par la formation et le dépôt de plaques d'athérome, qui sont constituées de lipides et de macrophages. Ces plaques évoluent ensuite en plaques fibreuses, avec l'apparition de cellules musculaires lisses et conjonctives (Liu *et al.*, 2004). Tandis qu'elles sont peu ou pas présentes dans les artères en conditions physiologiques, les cathepsines K et S sont exprimées abondamment dans les macrophages et les cellules musculaires lisses des plaques d'athérome (Sukhova *et al.*, 1998 ; Lutgens *et al.*, 2007). Le fort potentiel élastinolytique de ces deux enzymes suggère qu'elles seraient impliquées dans la perte progressive d'élasticité de la paroi

artérielle durant l'athérosclérose (Shi *et al.*, 1992 ; Brömme *et al.*, 1996a). De plus, l'expression de la cystatine C, un puissant inhibiteur endogène des cathepsines à cystéine, diminue lors d'athérosclérose et d'anévrismes aortiques (Shi *et al.*, 1999a). En plus des cathepsines K et S, la cathepsine F semble prendre part à la progression de cette maladie (Oörni *et al.*, 2004). En effet, durant l'athérogenèse, des lipoprotéines de faible densité (*low-density lipoprotein*, LDL) sont dégradées et les particules générées fusionnent pour former des gouttelettes qui vont se déposer dans la paroi artérielle (Oörni *et al.*, 2004). Les cathepsines F et S seraient impliquées dans la dégradation des LDL conduisant à la formation de la plaque d'athérome (Linke *et al.*, 2006).

3.3.2.4. Cancer

Lors de phénomènes cancéreux, le développement tumoral passe par de nombreuses étapes qui requièrent l'intervention d'enzymes protéolytiques. Toutes les classes de protéases sont impliquées, y compris les cathepsines à cystéine (pour revue : Mohamed & Sloane, 2006). Dans un premier temps, les protéases vont induire l'angiogenèse, phénomène qui implique la dégradation de la matrice extracellulaire et la libération par clivage de facteurs pro-angiogéniques (pour revue : Gocheva & Joyce, 2007). Puis elles permettent l'invasion des cellules cancéreuses à proximité de la tumeur, via la destruction des jonctions intercellulaires et la dégradation de la matrice extracellulaire. Enfin, les protéases permettent la dissémination des métastases à travers les systèmes vasculaires et lymphatiques, jusqu'à des sites secondaires (pour revue : Palermo & Joyce, 2008). Ces protéases, et notamment les cathepsines à cystéine, peuvent être sécrétées par les cellules tumorales, mais aussi par les cellules du micro-environnement tumoral : fibroblastes, macrophages, cellules endothéliales, ostéoclastes, etc. (**Figure 17**). Le déséquilibre entre l'expression des cathepsines à cystéine et de leurs inhibiteurs endogènes est plus marqué chez les patients atteints de tumeurs malignes que ceux ayant des tumeurs bénignes, ce qui suggère un rôle important de ces enzymes dans les phénomènes cancéreux (Kos & Lah, 1998). En effet, la sur-expression des cathepsines à cystéine a été démontrée dans de nombreuses tumeurs telles que les cancers du sein, des poumons ou du cerveau (Berdowska, 2004). Il existe plusieurs mécanismes conduisant à une augmentation de l'expression des cathepsines, dont l'amplification génique (cathepsine B) et l'épissage alternatif qui donne lieu à des variants plus efficacement traduits (cathepsines B et L) (Mohamed & Sloane, 2006). Avec les MMP, les cathepsines à cystéine seraient impliquées notamment dans la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire. En effet, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques des cathepsines à cystéine

induit une diminution de l'invasion de cellules cancéreuses à travers un modèle de membrane basale. Ainsi, une équipe de l'INSERM U1069 « Nutrition, Croissance et Cancer » de Tours en collaboration avec le groupe de G. Lalmanach, a montré que parmi les différentes classes de protéases testées, les cathepsines à cystéine représentent 65 % des protéases responsables de la dégradation d'un modèle de membrane basale par des cellules cancéreuses mammaires (Gillet *et al.*, 2009). De plus, l'activité protéolytique des cathepsines est favorisée puisque le micro-environnement tumoral est généralement acide (Cardone *et al.*, 2005). Les cathepsines à cystéine participent également à la vascularisation des tumeurs (angiogenèse). Ainsi, la sur-expression de la cathepsine B est corrélée avec l'angiogenèse dans un adénocarcinome du côlon (Kruszewski *et al.*, 2004), tandis que le blocage de son expression par une stratégie antisens supprime l'angiogenèse dans un modèle de glioblastome (Yanamandra *et al.*, 2004). De la même façon, l'ablation génique de la cathepsine S chez des souris prévient l'angiogenèse et la prolifération tumorale (Wang *et al.*, 2006). Les cathepsines à cystéine sont donc considérées à l'heure actuelle comme des cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de cancers (**Tableau 8**) (Palermo & Joyce, 2008).

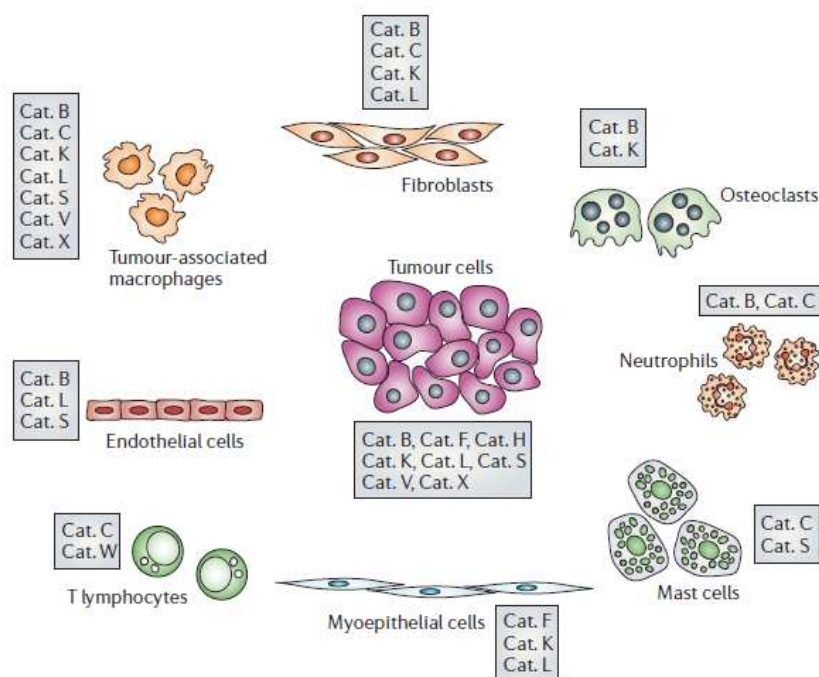


Figure 17 : Profil d'expression des cathepsines à cystéine au niveau de l'environnement tumoral.
(Mohamed & Sloane, 2006)

3.3.2.5. Pathologies pulmonaires

Il est désormais bien établi que les cathepsines à cystéine sont impliquées dans les phénomènes d'inflammations pulmonaires aux côtés des MMP et des protéases à sérine (pour revue : Kasabova *et al.*, 2011, **Annexe 1**). Des études menées dans notre laboratoire ont révélé une présence importante de cathepsines extracellulaires actives dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire (LLBA) de patients atteints d'inflammations pulmonaires aiguës (sarcoïdose), probablement d'origine macrophagique, tandis que les kininogènes sont retrouvés fortement dégradés (Serveau-Avesque *et al.*, 2006). Des résultats similaires ont été observés dans les LLBA de patients atteints de silicose (Perdereau *et al.*, 2006). Les cathepsines, sécrétées dans le milieu extracellulaire par les macrophages, se retrouvent en concentrations supérieures à celles de leurs inhibiteurs endogènes, entraînant un déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases qui entretient le processus inflammatoire et conduit à une dégradation excessive des constituants de la matrice extracellulaire pulmonaire, principalement les collagènes et l'élastine (Reddy *et al.*, 1995 ; Chapman *et al.*, 1997). Il en résulte la destruction du parenchyme pulmonaire et une perte de son élasticité, phénomène connu sous le nom d'emphysème, et qui est retrouvé dans certaines pathologies pulmonaires, notamment la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) (Wolters & Chapman, 2000). Les cathepsines K, L et S, de par leur potentiel élastinolytique, prennent ainsi part au développement de l'emphysème (Takahashi *et al.*, 1993). Si l'emphysème résulte d'un excès de dégradation, la fibrose, elle, est la conséquence d'un excès de synthèse de collagène, qui va alors s'accumuler jusqu'à une perte progressive de la fonctionnalité des poumons. L'induction d'une fibrose pulmonaire par la bléomycine chez des souris déficientes en cathepsine K résulte en une fibrose encore plus importante que chez les souris contrôles (Bühling *et al.*, 2004). À l'inverse, la sur-expression de cette enzyme dans le même modèle de souris fibrotiques permet de réduire l'accumulation de collagène et de rétablir en partie la fonctionnalité pulmonaire (Srivastava *et al.*, 2008). Ces études démontrent donc le rôle protecteur de la cathepsine K contre la fibrose pulmonaire. Plusieurs études montrent que l'administration de curcumine, un anti-oxydant polyphénolique présent dans le curcuma, réduit l'inflammation pulmonaire et l'accumulation de collagène dans des modèles animaux de fibrose pulmonaire (Xu *et al.*, 2007 ; Smith *et al.*, 2010). L'équipe de D. Brömme a récemment reporté que l'expression des cathepsines K et L, et dans une moindre mesure celle des cathepsines B et S, serait augmentée en réponse à une administration de curcumine dans un modèle de fibrose pulmonaire (Zhang *et al.*, 2011). Les propriétés antifibrotiques de la curcumine seraient alors associées en partie à l'activité protéolytique des cathepsines. En plus

de leur rôle dans la dégradation matricielle, les cathepsines pourraient être impliquées dans le développement des infections observées lors de pathologies inflammatoires telles que la mucoviscidose, l'emphysème et la silicose (Taggart *et al.*, 2003). En effet, les cathepsines peuvent dégrader et inactiver différents peptides ou protéines à activité antimicrobienne présents au niveau pulmonaire, tels que les β -défensines (HBD-1, -2, -3), la lactoferrine, le SLPI et la protéine du surfactant SP-A (Taggart *et al.*, 2001 ; Taggart *et al.*, 2003 ; Rogan *et al.*, 2004 ; Lecaille *et al.*, en préparation, **Annexe 2**).

3.3.2.6. Autres pathologies

En plus de ces pathologies pour lesquelles l'implication des cathepsines à cystéine est à présent bien établie, il existe d'autres maladies dans lesquelles ces protéases sembleraient intervenir. Les cathepsines et plus particulièrement la cathepsine S semblent être associées à l'obésité (pour revue : Taleb & Clément, 2007). En effet, il y aurait une forte corrélation entre la sur-expression de la cathepsine S et l'indice de masse corporel (IMC). La cathepsine S, exprimée par les cellules adipeuses, participerait à la différenciation des pré-adipocytes. Il en serait de même pour la cathepsine K (Chiellini *et al.*, 2003). De plus, la cathepsine B est impliquée dans la maladie d'Alzheimer, maladie neurodégénérative caractérisée par une perte de la mémoire et la formation de plaques β -amyloïdes neurotoxiques dans le cerveau. Cette plaque β -amyloïde est libérée à partir de son précurseur par des protéases, les β - et γ -sécrétases. La cathepsine B a été proposée comme β -sécrétase (Hook *et al.*, 2005), et l'inhibition de cette enzyme par des inhibiteurs synthétiques contribuerait à améliorer la mémoire et réduire la formation de plaques β -amyloïdes dans un modèle murin d'Alzheimer (Hook *et al.*, 2008). Un inhibiteur de la cathepsine B est par ailleurs actuellement développé dans le cadre d'un traitement de cette pathologie (**Tableau 8**).

3.4. Cathepsines à cystéine et peau

Plusieurs cathepsines à cystéine sont présentes au niveau de la peau : les cathepsines B, C, H, K, L, S et V (Schwarz *et al.*, 2002 ; Büth *et al.*, 2004). Des études, à la fois au niveau des transcrits (par PCR) et des protéines (par immunomarquage), ont révélé que les cathepsines sont principalement exprimées par les kératinocytes ; certaines d'entre elles (cathepsines B, K et L) étant également retrouvées dans les mélanocytes et les fibroblastes (Khalfan, 1991). La plupart des fonctions physiologiques et pathologiques des cathepsines à cystéine au niveau de la peau ont été mises en évidence par l'utilisation de souris déficientes en cathepsine.

3.4.1. Fonctions physiologiques

3.4.1.1. Maturation protéique

Comme pour le reste de l'organisme, les cathepsines sont impliquées dans la maturation de protéines au niveau de la peau. La cathepsine L semble participer à la dégradation de la filaggrine en acides aminés libres, à l'origine des facteurs naturels d'hydratation de la couche cornée (Kawada *et al.*, 1995). De plus, la cathepsine L permettrait la maturation de la trichohyaline, une protéine de structure présente dans l'enveloppe cornée et au niveau du follicule pileux (Tobin *et al.*, 2002). Enfin, elle serait également responsable de la maturation et de l'activation de la transglutaminase TG-3 (Cheng *et al.*, 2006), enzyme essentielle à la formation de l'enveloppe cornée, et qui compte pour plus de 75 % de l'activité des transglutaminases dans l'épiderme (Kim *et al.*, 1990).

3.4.1.2. Différenciation épidermique

L'implication et le rôle de la cathepsine L dans l'homéostasie cutanée ont été démontrés par l'utilisation de souris déficientes en cette enzyme (*ctsl*^{-/-}) (pour revue : Zeeuwen, 2004). Ces souris présentent une morphologie cutanée anormale se caractérisant par une hyperplasie épidermique (augmentation du nombre de kératinocytes) et une hyperkératose (épaississement de la couche cornée) (Roth *et al.*, 2000 ; Potts *et al.*, 2004). Elles présentent également un cycle capillaire défectueux, avec une atrophie folliculaire accompagnée d'une perte périodique de poils (Tobin *et al.*, 2002). Ce phénotype est d'ailleurs similaire aux phénotypes des souris « *furless* » (Green, 1954) et « *nackt* » (Benavides *et al.*, 1999), qui ont tous deux pour origine une mutation dans le gène de la cathepsine L. La cathepsine V, qui présente une

forte similarité (environ 75 %) avec la cathepsine L (humaine et murine), est une cathepsine qui n'existe pas chez la souris. De façon intéressante, l'insertion du gène codant pour la cathepsine V humaine chez ces souris déficientes *ctsl*^{-/-} permet de rétablir un phénotype normal (**Figure 18**), ce qui suggère que la cathepsine V a également un rôle important dans l'homéostasie cutanée humaine (Hagemann *et al.*, 2004). De plus, il a été montré qu'une protéase de type cathepsine L dégrade les récepteurs à l'EGF (Hiwasa *et al.*, 1988), ce qui est en corrélation avec l'augmentation du facteur de croissance EGF et de ses récepteurs qui est observée chez des souris déficientes en cathepsine L, dont résulte l'hyperprolifération de leurs kératinocytes (Reinheckel *et al.*, 2005). Ainsi, les cathepsines L et V réguleraient la prolifération des kératinocytes et donc leur différenciation en partie via la modulation de certains facteurs de croissance.



Figure 18 : Rétablissement d'un phénotype capillaire normal chez des souris *ctsl*^{-/-}, par insertion du gène codant la cathepsine V humaine.

Les photographies ont été prises 30 jours après la naissance : souris wild-type (flèche), souris *ctsl*^{-/-} (*) et souris *ctsv*^{+/ctsl}^{-/-} (**) (Hagemann *et al.*, 2004).

3.4.1.3. Desquamation

Après transformation des kératinocytes différenciés de la couche granuleuse en cornéocytes, ces derniers sont éliminés de la surface de la peau grâce à la dégradation de leurs jonctions intercellulaires, les cornéodesmosomes : c'est le processus de desquamation, étape ultime de la différenciation épidermique (pour revue : Ishida-Yamamoto & Kishibe, 2011). Avec la cathepsine D et les kallikréines KLK5, KLK7 et KLK14, la cathepsine V est une des protéases impliquées dans l'hydrolyse des protéines desmosomales (cornéodesmosines) responsables de la cohésion des cornéocytes (Watkinson, 1999 ; Bernard *et al.*, 2003 ; Zeeuwen *et al.*, 2007). Ce phénomène doit être régulé car une dégradation précoce des cornéodesmosomes altère la fonction barrière de la peau, tandis qu'une dégradation retardée conduit à l'hyperkératose (ichtyose). Dans la peau, l'activité protéolytique des cathepsines à cystéine est régulée par la

présence d'inhibiteurs endogènes spécifiques comme la cystatine M/E. Des souris « *ichq* », déficientes en cystatine M/E, développent un phénotype sévère caractérisé par une desquamation anormale, qui se traduit par une perte de la fonction barrière de la peau et une déshydratation importante avec une forte mortalité néonatale (Zeeuwen *et al.*, 2002). Bien que le gène de la cystatine M/E ne soit pas le gène responsable de l'ichtyose harlequin humaine (Zeeuwen *et al.*, 2003), ces études montrent l'importance de la cystatine M/E et plus généralement de la balance protéases/antiprotéases dans l'homéostasie cutanée.

De façon surprenante, l'expression de la cathepsine V (aussi nommée L2) dans les kératinocytes et les mélanocytes est inversement corrélée avec la couleur de la peau (Chen *et al.*, 2006). En effet, le niveau de cathepsine V dans les kératinocytes est 7,5 fois plus élevé chez les personnes à peau claire qu'à peau foncée (étude par puce à ADN). Dans cette étude, l'activité totale des cathepsines à cystéine est également plus importante dans les lysats de cellules issues de peau claire. Cependant, aucune étude n'a établi de lien entre cathepsine et mélanogénèse. Selon ces auteurs, il est plus probable que la faible expression de la cathepsine V soit à l'origine de l'aspect terne et cendré, phénomène fréquent chez les peaux foncées, qu'à la couleur de la peau. En effet, suite à un mauvais processus de desquamation, les cellules mortes à la surface de la couche cornée ne reflètent plus correctement la lumière, conduisant à cet aspect terne.

3.4.1.4. Cicatrisation cutanée

Après une blessure, la fonction barrière de la peau est rompue (pour revue : Martin, 1997). Les vaisseaux sanguins endommagés à proximité de la blessure vont recruter des thrombocytes, des fibres de fibrine et des plaquettes, qui vont permettre la formation d'un caillot de fibrine, recouvrant et protégeant ainsi la plaie. Ce caillot est un réservoir de facteurs de croissance qui vont initier le phénomène de cicatrisation. En effet, ils vont permettre un recrutement de cellules inflammatoires (neutrophiles, macrophages), qui vont nettoyer la plaie des débris organiques et éventuels organismes pathogènes par phagocytose. Puis les fibroblastes et les kératinocytes vont migrer au site de la lésion afin de régénérer le tissu cutané, via un équilibre entre la dégradation partielle de la matrice extracellulaire et la biosynthèse de ses constituants. Enfin, lorsque toute la plaie a été recouverte d'une monocouche de kératinocytes, ceux-ci prolifèrent et se différencient afin de ré-épithélialiser la blessure.

Les enzymes impliquées dans la dégradation matricielle sont les protéases à sérine comme la plasmine, les MMP, mais les cathepsines à cystéine seraient également impliquées. En effet,

durant la migration des kératinocytes, certaines cathepsines, et plus particulièrement la cathepsine B, peuvent être sécrétées (Büth *et al.*, 2004 ; Büth *et al.*, 2007). Elles permettraient d'une part la dissociation des kératinocytes par dégradation des jonctions intercellulaires, phénomène à l'origine de leur migration ; et interviendraient d'autre part dans le remodelage matriciel par leur capacité à dégrader le collagène IV et les protéoglycanes. De plus, la cathepsine K jouerait un rôle essentiel lors de la cicatrisation cutanée au niveau du derme (Rünger *et al.*, 2007). En effet, bien que peu ou pas exprimée dans le derme en conditions physiologiques, la cathepsine K est cependant fortement détectée dans des fibroblastes à proximité de cicatrices. Elle serait responsable de la dégradation intracellulaire des collagènes et empêcherait les phénomènes de fibrose.

3.4.2. Fonctions physiopathologiques

3.4.2.1. Psoriasis

Le psoriasis est une maladie inflammatoire auto-immune complexe touchant environ 2 à 3 % de la population mondiale, et qui a pour origine une prédisposition génétique et des facteurs environnementaux favorisant (stress, micro-organismes, ...) (pour revue : Nestle *et al.*, 2009). Cette affection dermatologique est caractérisée par des lésions de la peau, causées par une hyperprolifération épidermique et une maturation précoce des kératinocytes entraînant une cornification incomplète. Ces caractéristiques histologiques s'accompagnent également d'une composante inflammatoire avec une infiltration de lymphocytes T et de cellules de Langerhans au niveau de l'épiderme. Dans l'épiderme, la réponse immunitaire est assurée par les cellules de Langerhans, mais également par les kératinocytes, qui sous l'influence de cytokines pro-inflammatoires comme l'interféron- γ peuvent exprimer les molécules du CMH de classe II et devenir ainsi des cellules présentatrices d'antigènes non professionnelles. Il a été montré une induction des ARN et de la synthèse protéique de cathepsine S dans des kératinocytes humains normaux en réponse à l'IFN- γ (Schwarz *et al.*, 2002). Cela se traduit par une augmentation de l'activité de la cathepsine S, tandis que les niveaux d'activité des cathepsines B et L restent inchangés. De la même façon, la cathepsine S est sur-exprimée dans des kératinocytes de patients atteints de psoriasis (Schönefuss *et al.*, 2010). En effet, les lymphocytes T, en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ et le TNF- α , stimuleraient l'expression de la cathepsine S (forme mature et proforme), induisant ainsi la présentation d'auto-antigènes par les kératinocytes. La cathepsine S serait impliquée dans le

caractère auto-immun de la maladie et serait donc une cible thérapeutique d'intérêt dans le traitement du psoriasis. Deux inhibiteurs spécifiques de cette enzyme sont actuellement en phases d'essais cliniques (**Tableau 8**).

3.4.2.2. Dermatite atopique (eczéma)

La dermatite atopique, appelée plus couramment eczéma, est une maladie inflammatoire qui a pour origine une barrière cutanée anormale, touchant principalement les nourrissons et les enfants (pour revue : Rybojad, 2012). Elle résulte d'une prédisposition génétique importante et de facteurs environnementaux (sécheresse, chaleur, savons, ...) qui vont favoriser l'apparition des lésions. Cette pathologie serait due en partie à des mutations dans le gène de la filaggrine (Palmer *et al.*, 2006). En effet, cette protéine clé impliquée dans la fonction barrière de la peau n'est alors plus ou mal produite, ce qui permet aux pathogènes et allergènes de pénétrer dans la peau. Cela va stimuler le système de défense immunitaire qui va réagir de façon excessive et entretenir une inflammation chronique, provoquant rougeurs et démangeaisons. Ces démangeaisons résultent de l'activation par des protéases des récepteurs PAR (pour *proteinase-activated receptor*). Un niveau élevé d'expression des récepteurs PAR-2 a été observé au niveau des fibres nerveuses et des kératinocytes de patients souffrant de dermatite atopique (Steinhoff *et al.*, 2003) ; et la cathepsine S serait une des protéases capables d'activer ce récepteur (Reddy *et al.*, 2010). De plus, une étude très récente a montré que des souris chez lesquelles la cathepsine S était sur-exprimée développaient des troubles cutanés similaires à la dermatite atopique (Kim *et al.*, 2012). Ces résultats suggèrent que la sur-expression de la cathepsine S induit l'activation des récepteurs PAR-2, provoquant démangeaisons et irritations, et participe ainsi à la pathogenèse de la dermatite atopique.

3.4.2.3. Syndrome de Papillon-Lefèvre

Comme la pycnodysostose qui est due à des mutations dans le gène de la cathepsine K (voir Chapitre 3.3.2.1.), le syndrome de Papillon-Lefèvre est une maladie humaine causée par une déficience en cathepsine C (Hart *et al.*, 1999). C'est une maladie génétique autosomale récessive très rare, touchant 1 à 4 personnes sur un million dans le monde, dont la moitié des cas reportés seraient issus de parents consanguins. Le syndrome de Papillon-Lefèvre est caractérisé par une hyperkératose psoriasiforme palmoplantaire et une destruction du tissu parodontal (Toomes *et al.*, 1999). Les souris « *nackt* » déficientes en cathepsine L présentent des caractéristiques communes à cette pathologie, comme l'hyperkératose, suggérant que les cathepsines L et C auraient des fonctions complémentaires dans la peau (Benavides *et al.*,

2002). La cathepsine C, aussi connue sous le nom de DPPI (pour *dipeptidylpeptidase I*) joue un rôle important dans la maturation de protéases à sérine comme la cathepsine G, la protéase-3 et l'élastase. Il a été d'ailleurs montré que ces enzymes font défaut chez les patients atteints du syndrome de Papillon-Lefèvre, en adéquation avec la sensibilité plus importante aux infections retrouvées chez 15 à 20 % de ces patients (Pham *et al.*, 2004). Certains syndromes présentant eux-aussi une hyperkératose palmoplantaire sont associés à des mutations touchant les gènes des kératines. Cela suggère que la cathepsine C pourrait intervenir de façon indirecte dans la maturation des kératines, protéines de maintien et de structure de l'épiderme (Nuckolls & Slavkin, 1999).

3.4.2.4. Mélanome

Les cathepsines à cystéine sont impliquées dans de nombreux cancers (voir Chapitre 3.3.2.4.), et il en est de même pour les cancers de la peau comme le mélanome (Dennhöfer *et al.*, 2003). Le mélanome compte pour une faible proportion des cancers de la peau mais est la principale cause de décès par cancer cutané dans le monde et se place au dixième rang des décès par cancer (source OMS). Les facteurs de risque de ce cancer sont le niveau de pigmentation de la peau et l'exposition aux UV (soleil, cabines de bronzage). La cathepsine K est fortement exprimée dans des mélanomes primaires, où elle participerait à la dégradation matricielle associée à l'invasion tumorale. En effet, l'inhibition de la cathepsine K réduit d'environ 90 % l'invasion de cellules de mélanome à travers un modèle de membrane basale et diminue la dégradation du collagène IV internalisé dans les lysosomes (Quintanilla-Dieck *et al.*, 2008). L'expression et l'activité des cathepsines B et L sont également augmentées dans des cellules de mélanome (Fröhlich *et al.*, 2001 ; Stabuc *et al.*, 2006). Récemment il a été montré que la cystatine M/E permet de réduire le potentiel invasif de cellules de mélanome, mais cela ne passerait pas par une régulation de la cathepsine B mais par celle d'une autre protéase à cystéine présente dans la peau, la légumaine (Briggs *et al.*, 2010).

3.4.2.5. Vieillissement cutané

Bien que l'implication des protéases dans la physiopathologie du vieillissement cutané soit à présent bien établie, peu d'études se sont intéressées au statut des cathepsines à cystéine. Cependant, des études d'immunomarquage sur des coupes de peau d'origine asiatique ont montré que l'expression protéique des cathepsines B et K diminuerait avec le vieillissement photo-induit, tant dans l'épiderme que dans le derme (Lai *et al.*, 2010 ; Zheng *et al.*, 2011). Dans ces deux études, un traitement chimique (8-méthoxysporalène et irradiation UVA)

réalisé sur des fibroblastes humains normaux, à l'origine de l'entrée en sénescence de ces cellules, se répercute par une diminution de l'expression génique et protéique des cathepsines B et K. Par ailleurs, l'irradiation UV (UVA + UVB) de fibroblastes humains et d'explants cutanés induirait une augmentation de l'expression de la cathepsine K, notamment sous sa forme mature, ce qui suggère que la cathepsine K pourrait intervenir dans la dégradation de la matrice extracellulaire associée au vieillissement cutané (Codriansky *et al.*, 2009).

Ainsi, les cathepsines à cystéine, qui sont impliquées dans l'homéostasie cutanée (**Figure 19**), pourraient être des marqueurs du vieillissement de la peau.

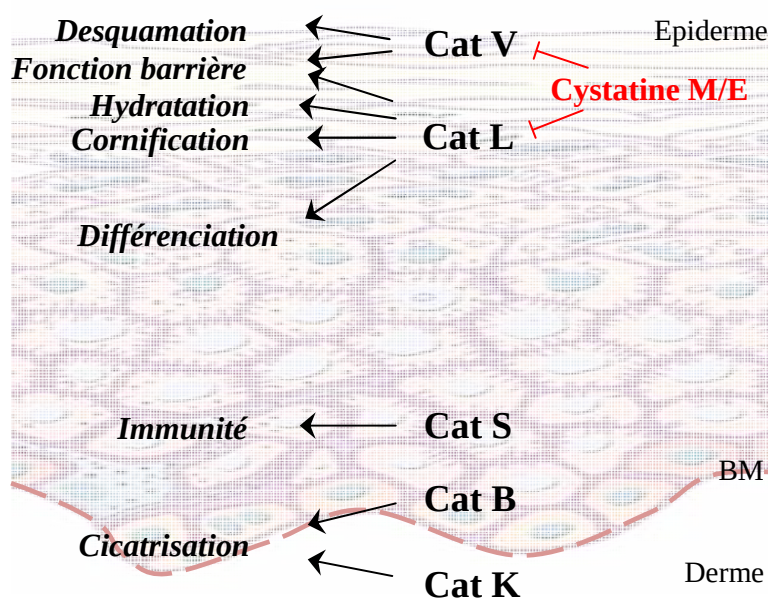


Figure 19 : Schéma récapitulatif des rôles connus des cathepsines à cystéine dans l'homéostasie cutanée.

II - Travaux personnels

Qu'il soit physiologique ou induit par les expositions solaires répétées, le vieillissement cutané s'accompagne de nombreux changements : variations hormonales, détérioration du système anti-oxydant conduisant au stress oxydatif, ou encore déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases en faveur de la protéolyse. Cela conduit à d'importantes altérations structurales et fonctionnelles des constituants de la matrice extracellulaire et de la membrane basale, à l'origine des rides et de la perte d'élasticité de la peau qui apparaissent avec l'âge. Dans ce contexte, l'implication des MMP et des protéases à sérine a été largement documentée. En effet, les kératinocytes et les fibroblastes sur-expriment les MMP avec l'âge, phénomène qui est par ailleurs exacerbé dans le photovieillissement suite à l'irradiation de ces cellules par les rayonnements UV. En parallèle, le stress oxydatif peut générer une inflammation cutanée, qui va conduire au recrutement de cellules pro-inflammatoires et à la libération de protéases à sérine, dont l'élastase. Ces deux classes de protéases sont alors responsables de la dégradation excessive et de la désorganisation des réseaux de collagène et d'élastine du derme et de la JDE observées au cours du vieillissement. À ce jour, le rôle d'autres classes de protéases et plus particulièrement celui des cathepsines à cystéine dans la physiopathologie du vieillissement cutané a été peu décrit. Bien que leur fonction première consiste en la dégradation et le recyclage des protéines intracellulaires dans les lysosomes, il est à présent bien établi que cette classe de protéases intervient dans de nombreux processus biologiques variés, comme l'activation de précurseurs protéiques, la présentation des antigènes au CMH de classe II ou encore le remodelage osseux. De plus, certaines de ces cathepsines, les cathepsines K, L, S et V, ont démontré un fort potentiel collagénolytique et élastinolytique, et l'on sait désormais qu'elles peuvent être actives dans le milieu extracellulaire. Ces enzymes sont régulées en conditions physiologiques par des facteurs environnementaux, tels que le pH, la température, la présence d'inhibiteurs endogènes et de glycosaminoglycanes. En effet, les GAG, qui sont présents dans la matrice extracellulaire et dans les compartiments lysosomaux, peuvent interagir avec les cathepsines et ainsi moduler leurs activités. Il est bien établi que les GAG peuvent inhiber l'activité des cathepsines, notamment au niveau des lysosomes, ou au contraire stimuler leur activité protéolytique, comme c'est le cas pour la cathepsine K dont l'activité collagénolytique nécessite la présence de C4-S.

Dans ce contexte, notre projet, en collaboration avec le Département Sciences du Vivant de LVMH Recherche Parfums & Cosmétiques, a consisté à étudier le statut des cathepsines à cystéine au niveau de l'épiderme durant le vieillissement cutané, leur implication dans le

remodelage de la membrane basale et l'identification de leurs cibles moléculaires, ainsi que leur mode de régulation par des glycosaminoglycanes. Dans un premier temps, nous avons mis en évidence l'expression des cathepsines dans l'épiderme par immunofluorescence et identifié leurs cibles moléculaires au niveau de la membrane basale, et plus particulièrement celles de la cathepsine S qui est localisée à proximité de la JDE. Le nidogène-1, protéine essentielle à l'organisation de la membrane basale via de multiples interactions avec les autres constituants, est par ailleurs efficacement dégradé par la cathepsine S. Nous avons alors analysé les conséquences de cette hydrolyse sur l'organisation structurale de la membrane basale par des techniques de rhéologie, ELISA et BIAcore (**Article 1**).

La cathepsine S étant capable de dégrader les différents constituants de la membrane basale et de perturber leurs interactions, nous nous sommes ensuite intéressés à la régulation de son activité protéolytique par différents glycosaminoglycanes sulfatés (héparine, héparane sulfate, chondroïtines 4- et 6-sulfate, dermatane sulfate) et non sulfatés (acide hyaluronique). En effet, parmi les études montrant la régulation des cathepsines à cystéine par des GAG, peu ont porté sur la cathepsine S. Nous avons mis en évidence que le C4-S, qui est présent dans la peau, perturbe l'activité peptidasique et protéolytique de la cathepsine S de façon dose-dépendante. L'interaction entre ces deux molécules a ensuite été caractérisée par des approches biochimiques telles que la cinétique enzymatique, la chromatographie liquide et le BIAcore. En parallèle, une analyse de modélisation moléculaire a permis d'identifier trois sites potentiels de fixation du C4-S au niveau de la cathepsine S (**Article 2**, en préparation).

D'autre part, nous nous sommes intéressés au statut des cathepsines à cystéine durant le vieillissement de la peau. Nous avons réalisé par immunofluorescence une étude de l'expression protéique des principales cathepsines à cystéine (cathepsines B, K, L, S et V) dans l'épiderme de peaux normales humaines jeunes et âgées d'origine Caucasienne. Alors que pour certaines cathepsines l'expression protéique reste constante avec l'âge (cathepsines B et L), pour d'autres et notamment la cathepsine S, l'expression diminue ; l'effet étant plus marqué avec la photo-exposition. Cette diminution est corrélée avec une diminution de l'activité enzymatique des cathepsines chez les personnes âgées (**Article 3**, en préparation).

Partie 1

Étude de l'hydrolyse des constituants
majoritaires de la membrane basale par les
cathepsines à cystéine humaines B, K, L et S

1. Étude de l'hydrolyse des constituants majoritaires de la membrane basale par les cathepsines à cystéine humaines B, K, L et S

Article 1 : Cleavage of nidogen-1 by cathepsin S impairs its binding to basement membrane partners

J. Sage, E. Leblanc-Noblesse, C. Nizard, T. Sasaki, S. Schnebert, E. Perrier, R. Kurfurst, D. Brömme, G. Lalmanach & F. Lecaille (2012)

PLoS ONE, 7: e43494

Le renouvellement de la membrane basale que ce soit lors de processus physiologiques ou pathologiques (réparation et remodelage tissulaires, inflammation, cancer) met en jeu de nombreuses protéases. Dans ce contexte, l'implication des protéases à sérine et des MMP a été largement documentée, mais d'autres classes de protéases peuvent intervenir, comme les cathepsines à cystéine. En effet, il est désormais bien établi que les cathepsines, bien que lysosomales, peuvent être sécrétées et rester actives dans le milieu extracellulaire où elles prennent part à la dégradation de constituants matriciels tels que les collagènes et l'élastine (Lecaille *et al.*, 2008). Au niveau de la membrane basale, le collagène IV et la laminine sont des cibles moléculaires déjà décrites des cathepsines (Guinec *et al.*, 1993). Le nidogène, protéine importante permettant la connexion des réseaux de collagène IV et de laminine au sein de la membrane basale et l'intégration du perlécan et d'autres protéines présentes en plus faibles quantités, est sensible à la protéolyse par les MMP et les protéases à sérine (Mayer *et al.*, 1993). Cependant, la capacité des principales cathepsines à cystéine humaines, les cathepsines B, K, L et S, à dégrader cette protéine cruciale à l'intégrité architecturale de la membrane basale n'a jamais été reportée.

Dans un premier temps, nous avons confirmé par immunofluorescence sur des coupes de peaux normales humaines la localisation des cathepsines B, K, L et S dans les différentes couches de l'épiderme, et notamment à proximité de la JDE. De plus, ces cathepsines sont détectées par western-blot dans des surnageants de culture de kératinocytes humains normaux,

ce qui nous a permis de montrer que ces cellules expriment et sécrètent dans le milieu extracellulaire les cathepsines, sous forme de proformes mais également sous forme active (110 nmol/g de protéines en cathepsines totales). Une étude d'invasion cellulaire nous a permis de mettre en évidence que les cathepsines sécrétées sont capables de dégrader un modèle de membrane basale dérivé de la tumeur murine EHS, permettant ainsi aux kératinocytes de migrer. En effet, l'ajout d'un inhibiteur spécifique des cathepsines à cystéine, l'E-64, réduit d'environ $38 \pm 5 \%$ l'invasion cellulaire, et ce, de façon significative ($p < 0,01$). La cathepsine S pourrait être particulièrement impliquée dans la dégradation de la membrane basale puisque contrairement aux autres cathepsines elle peut rester active et stable à pH 7,4, pH retrouvé au niveau de la JDE. En effet, la cathepsine S est capable *in vitro* de dégrader efficacement les quatre constituants majoritaires de la membrane basale (laminine, collagène IV, nidogène-1 et perlécan), même lorsqu'ils sont complexés ensemble au sein d'un modèle de membrane basale (EHS). Des analyses rhéologiques montrent que l'hydrolyse de ce modèle de membrane basale par la cathepsine S a pour effet de diminuer les paramètres visco-élastiques de cette membrane basale et donc probablement de perturber son intégrité architecturale. Nous nous sommes alors intéressés à élucider les mécanismes conduisant à la désorganisation de la membrane basale. Une attention particulière a été portée au nidogène-1, pour lequel nous avons montré pour la première fois la sensibilité à la protéolyse par les cathepsines à cystéine, en particulier la cathepsine S, et ce, même à pH neutre. De plus, le nidogène-2, autre membre de la famille des nidogènes, est également une cible de ces enzymes. Les sites de clivage du nidogène-1 par la cathepsine S ont été localisés à des sites différents de ceux décrits pour les autres classes de protéases (segment reliant G1 à G2 et domaine G3), au niveau des domaines G2 et G3 impliqués dans les interactions du nidogène-1 avec ses principaux partenaires (laminine, collagène IV et perlécan). Nous nous sommes alors interrogés quant à l'impact de l'hydrolyse du nidogène-1 par la cathepsine S sur ses interactions avec les autres constituants de la membrane basale. Des études en BIAcore et en ELISA nous ont permis de mettre en évidence que la cathepsine S est capable de dissocier les interactions préalablement établies entre le nidogène-1 et ses partenaires, perturbant ainsi l'organisation structurale de la membrane basale, à l'origine de la réduction de ses propriétés visco-élastiques observée en rhéologie.

En conclusion, les cathepsines à cystéine et plus particulièrement la cathepsine S, après avoir été sécrétées par les kératinocytes pourraient prendre part à la dégradation des constituants de la membrane basale, notamment le nidogène-1, et perturber son organisation structurale.

Ainsi, à côté d'autres classes de protéases, les cathepsines à cystéine pourraient intervenir dans le remodelage de la membrane basale requis lors de processus biologiques variés.

Cleavage of Nidogen-1 by Cathepsin S Impairs Its Binding to Basement Membrane Partners

Juliette Sage^{1,2,3}, Emmanuelle Leblanc-Noblesse³, Carine Nizard^{3,4}, Takako Sasaki⁵, Sylvianne Schnebert³, Eric Perrier³, Robin Kurfurst³, Dieter Brömme⁶, Gilles Lalmanach^{1,2}, Fabien Lecaille^{1,2*}

1 INSERM, UMR 1100, Pathologies Respiratoires: protéolyse et aérosolthérapie, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, Tours, France, **2** Université François Rabelais, UMR 1100, Tours, France, **3** Louis Vuitton Moët Hennessy (LVMH-Recherche), Saint Jean de Braye, France, **4** Laboratoire de Pharmacologie Cellulaire de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France, **5** Department of Experimental Medicine I, Nikolaus-Fiebiger Center for Molecular Medicine, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany, **6** University of British Columbia, Department of Oral Biological and Medical Sciences, Vancouver, British Columbia, Canada

Abstract

Cathepsin S (catS), which is expressed in normal human keratinocytes and localized close to the dermal-epidermal junction (DEJ) degrades some of major basement membrane (BM) constituents. Among them, catS readily hydrolyzed in a time and dose dependent manner human nidogen-1 (nid-1) and nidogen-2, which are key proteins in the BM structure. CatS preferentially cleaved nid-1 at both acid and neutral pH. Hydrolysis of nid-1 was hampered in murine *ctss*^{-/-} spleen lysates pretreated with inhibitors of other classes of proteases. Nid-1 was cleaved within its G2 and G3 globular domains that are both involved in interactions with other BM components. Binding assays with soluble and immobilized ligands indicated that catS altered the formation of complexes between nid-1 and other BM components. Assuming that the cleavage of nid-1 impairs its ability to crosslink with BM partners and perturbs the viscoelastic properties of BM matrix, these data indicate that catS may participate in BM proteolysis, in addition to already identified proteases.

Citation: Sage J, Leblanc-Noblesse E, Nizard C, Sasaki T, Schnebert S, et al. (2012) Cleavage of Nidogen-1 by Cathepsin S Impairs Its Binding to Basement Membrane Partners. PLoS ONE 7(8): e43494. doi:10.1371/journal.pone.0043494

Editor: Fernando Rodrigues-Lima, University Paris Diderot-Paris 7, France

Received: May 14, 2012; **Accepted:** July 23, 2012; **Published:** August 28, 2012

Copyright: © 2012 Sage et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was financially supported by LVMH Recherche (Saint Jean de Braye, France) and by institutional funding from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). DB was supported by a Canada Research Chair award. JS holds a doctoral fellowship from the Association Nationale de la Recherche Technique (ANRT, France; CIFRE PhD funding). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: JS, EL-N, CN, SS, EP, RK are employees of LVMH Recherche. This does not alter the authors' adherence to all of the PLoS ONE policies on sharing data and materials. The other authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: fabien.lecaille@univ-tours.fr

Introduction

The basement membrane (BM) is a continuous sheet of specialized extracellular matrix (ECM) that regulates tissue morphogenesis and cell functions like differentiation, migration and survival by providing the scaffolding that maintains normal tissue architecture during regeneration and growth [1]. The function of the BM is closely related to its composition [2]. The main components of the BM are intertwined networks of laminins and type IV collagens, linked together by non-covalent interactions with nidogens, which also bind to perlecan, a heparan sulfate proteoglycan (HSPG). Gene knock-out studies have shown that most of the major BM components are important for the integrity of the BM [3].

Nidogens are ubiquitous BM proteins, with nidogen-1 (nid-1) being more abundant in mammals while the pattern of nidogen-2 (nid-2) distribution is distinct from nid-1. Both nidogens play a central role in the supramolecular organization of the basal laminae in tissues such as skin, muscle, lung and the nervous system [4]. Nid-1 consists of a single polypeptide chain (150 kDa) that forms three globular domains, G1 (with an apparent molecular mass of 30–35 kDa), G2 (31 kDa), and G3 (44 kDa), separated from each other by either a flexible, protease-sensitive linker (G1, G2) or a longer rigid rod-like domain (G2, G3).

Though nid-1 cannot self-assemble, unlike most ECM molecules, it has several binding sites (localized to its G2 and G3 domains) for other BM components. Sequence data demonstrated that nidogens like many ECM proteins are constructed of common modules, including epidermal growth factor (EGF), thyroglobulin type-1 (Tg-1) and low density lipoprotein receptor. Similar Tg-1 domains, based on sequence motif of Cys-Trp-Cys-Val, have been found in many other proteins (saxiphilin, thyroperin, testican-1) [5]. A few of them were named thyroperins (thyroglobulin type-1 domain protease inhibitors) since they exhibit inhibitory activities against certain members of papain-like cysteine, aspartic proteases and metalloproteases [6–8]. Isolated nid-1 is readily hydrolyzed by serine proteases and metalloproteinases (MMPs) [9–13], however it is more resistant to degradation when complexed with laminin-111 ($\alpha 1 \beta 1 \gamma 1$) (the binding site for nidogens locates in gamma 1 chain) [14]. Consequently, the proteolytic degradation of nid-1 may trigger reorganization of the BM during the turnover of the extracellular matrix (ECM) that occurs in cell invasion and tissue transmigration. ECM turnover is directly correlated with the presence of proteases like MMPs, serine proteases, aspartic proteinases, and cysteine cathepsins [15]. The eleven cathepsins (B, C, F, H, K, L, S, O, V, W and X) are normally found in acidic compartments such as endosomes and lysosomes, but cysteine

cathepsins also act extracellularly, particularly in acidified pericellular environment. Further, cysteine cathepsins generally exhibit limited lifetimes at neutral pH, except for catS [16]. They can hydrolyze a broad range of ECM protein, including the collagens and elastin [17–19], but little is known about which cysteine cathepsins are involved in the degradation of the BM in skin and how they act. CatS readily participates to the extracellular matrix turn-over because it is active and stable at neutral pH and under oxidizing conditions, has a potent elastinolytic activity and can activate other cysteine cathepsins [16,20]. CatS is found in keratinocytes and phagocytic and antigen-presenting cells (macrophages, B lymphocytes, dendritic cells) of tissues such as the spleen, lung and skin.

In this study, immunofluorescence staining indicated that catS is localized close to the dermal-epidermal junction (DEJ) in normal skin. CatS secreted by primary cultures of human keratinocytes hydrolyzed several BM molecules, including nid-1 within a reconstituted BM. Cleavage sites were identified within G2 and G3 globular domains that are both involved in interactions with other BM components (type IV collagen, laminin, perlecan). Surface plasmon resonance and rheological analyses demonstrated that the stability of the BM and its networks were perturbed by the hydrolysis of nid-1 by catS. Thus, catS may participate with other identified proteases in the proteolysis of the skin BM.

Materials and Methods

Materials

Human cathepsins B, H, L, and S were purchased from Calbiochem (VWR International, Pessac, France) and catK was expressed in *Pichia pastoris* as described previously [21]. The active concentrations of these peptidases were determined by titration with L-3-carboxy-trans-2, 3-epoxy-propionyl-leucylamide-(4-guano)-butane (E-64) (Sigma-Aldrich, St Quentin le Fallavier, France) according to [22]. Assay buffers used for cathepsins activity were either 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5, 2 mM dithiothreitol (DTT) and 0.01% Brij35 (buffer A) or 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, 2 mM DTT, 0.01% Brij35 (buffer B). Morpholinourea-leucyl-homophenylalanine-vinyl-sulfone phenyl inhibitor (LHVS) was a kind gift from Dr. J. H. McKerrow (University of California, San Francisco, CA, USA). Laminin-211/221 (abbreviated forms corresponding respectively to chains: $\alpha 2\beta 1\gamma 1/\alpha 2\beta 2\gamma 1$) and type IV collagen (both from human placenta), perlecan and basement membrane extract, ECM gel (both derived from Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) mouse sarcoma) were obtained from Sigma-Aldrich. Fibronectin (from human plasma) was from Calbiochem. Recombinant human nid-1 and nid-2 and their specific antibodies were obtained from R&D Systems (Minneapolis, USA). Recombinant mouse nid-1 and its isolated globular domains (G1, G2 and G3) were prepared as previously described [23,24].

The antibodies used for western blot (WB) and immunofluorescence (IF) against cathepsins L and S were from R&D Systems; they were diluted to 1:1000 for WB and 1:50 for IF, except for catL (1:25). Anti-catB antibodies were from Calbiochem for WB (1:1000) and from R&D Systems for IF (1:50). Anti-catK antibody was from Fitzgerald (Interchim, Montluçon, France) and was diluted to 1:1000 for WB and 1:500 for IF. Antibodies for nid-1 and nid-2 were from R&D Systems (1:1000 for WB; 1:200 for IF). The anti-type IV collagen antibody used for WB (1:5000) was purchased from Abcam (Paris, France) and that for IF (1:200) was from Novocastra (A. Menarini Diagnostics France, Rungis, France). The anti-laminin (gamma 1 chain) antibody was from Neomarkers (Thermo Fisher Scientific, Francheville, France) for

WB (1:10000) and from Novocastra for IF (clone LAM-89; 1:200). The anti-perlecan antibody used for WB (1:500) was from Sigma-Aldrich. Polyclonal anti-keratin antibody used for WB (1:1000) was from Abcam.

The lack of cross reactivity of each anti-cathepsin B, L, K and S antibody was checked by western blot analysis on human cathepsins B, K, L and S (100 ng) and with keratins from human epidermis (Sigma-Aldrich) (Figure S1).

Ethic Statement

Human abdominal skin samples were purchased from Biopredic International (Rennes, France). All samples were collected from adult patients undergoing abdominal plastic surgery and were considered as “waste” and thus were exempt from ethical approval. Helsinki principles were adhered to and participants gave written, informed consent to provide samples for research.

Immunofluorescence

Biopsies of human skin were embedded in OCT (TissueTekSakura), frozen in liquid nitrogen and stored at -20°C . Sections (10 μm) were cut on a cryostat, placed on Superfrost+ slides (Dako, Trappes, France) and fixed in acetone at -20°C for 10 min. They were then rinsed with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated for 30 min with PBS containing 1% BSA at room temperature. They were washed three times with PBS and incubated with the primary antibodies overnight at 4°C in a dark humid chamber. The sections were rinsed with PBS and incubated with the appropriate secondary antibody (labeled with AlexaFluor 546, 1:200, Molecular Probes, Paisley, England) for 1 h at room temperature. Nuclei were stained with DAPI (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma-Aldrich). Negative controls were prepared without primary antibodies. The sections were given a final rinse with PBS, mounted with the Dako fluorescent mounting system, and stored at 4°C protected from light. Sections were analyzed with a SP 5 Leica confocal microscope (magnification: $\times 630$).

In parallel, cathepsins B, K, L and S were detected by immunoblot staining in whole epidermis extract from human skin (Biopredic International) by using a method adapted from [25]. Briefly, epidermis was homogenized in cold buffer containing 10 mM Hepes/KOH, pH 7.9, 10 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0.1 mM DTT, 0.1% (v/v) Nonidet P40, in presence of protease inhibitors cocktail (0.5 mM Pefabloc SC, 0.5 mM EDTA, 1 mM methylmethane-thiosulfonate (MMTS), 0.04 mM pepstatin A). After centrifugation (12 000 $\times g$) during 2 min, supernatants were collected and mixed with Laemmli buffer.

Cell Culture

Normal human adult keratinocytes isolated from abdominal skin (Biopredic International) according to [26] and immortalized non-tumorigenic keratinocyte HaCaT cells (kindly provided by Dr. N.E. Fusenig, Division of Carcinogenesis and Differentiation, German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany, [27]) were grown to 90% confluence in keratinocyte serum-free medium (KSFM, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 5 ng/mL epidermal growth factor (Invitrogen), 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ bovine pituitary extract (Invitrogen), 100 U/mL penicillin (Invitrogen), and 100 U/mL streptomycin (Invitrogen). Cells were grown at 37°C in saturated 5% CO_2 .

Transmigration Assays

Assays were performed in 24-well plates using a BD Biocoat growth factor reduced Matrigel chamber (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) with an 8- μm pore size membrane. Briefly,

human keratinocytes (5×10^4 cells per chamber) were seeded in KSFM on the upper compartment of the chamber. Supplemented KSFM was added to the lower compartment to stimulate cell migration. Cells were incubated at 37°C in saturated 5% CO_2 for 6 h. Invasion experiments were repeated in the presence of E-64 (20 μM). Cell migration assays were performed without pretreating keratinocytes with inhibitors of other classes of proteases. The treatment with E-64 had any influence in vitro on the proliferation/survival or size of keratinocytes. Non-invading cells from the interior of the inserts were removed by using cotton-tipped swabs. Cells that migrated through the membrane and attached to the bottom of the membrane were fixed, stained with hematoxylin and counted in the whole insert using a light microscope (200 $\times$ magnification). For easier comparison, the results obtained were normalized to the control condition. Values shown are the mean $\pm$ S.D.

Western Blot Analysis and Titration of Cathepsins in Supernatants

Supernatants and cells were harvested in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5, containing protease inhibitors (0.5 mM Pefabloc SC, 0.5 mM EDTA, 1 mM MMTS, 0.04 mM pepstatin A) and stored at -80°C . The protein concentrations in supernatants and cell lysates were determined with the bicinchoninic acid assays kit (BCA protein assay kit, Interchim, Montluçon, France). The proteins in concentrated supernatants (100 μg protein/well) were separated by 15% SDS-PAGE under reducing conditions and transferred to nitrocellulose membranes. Cathepsins were detected by immunoblotting using the antibodies listed above. The cathepsins in keratinocyte supernatants were activated in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5, 5 mM DTT, 0.01% Brij35 for 3 min at 37°C . The hydrolysis of 7-amino-4-methyl coumarin (AMC)-derived fluorogenic substrate was continuously recorded at 37°C with gentle agitation, with a Gemini spectrofluorimeter (Molecular Devices, Saint Grégoire, France) with $\lambda_{\text{exc}} = 350$ nm and $\lambda_{\text{em}} = 460$ nm. Each well of the 96-well microtiter plate (Nunc) contained 20 μl supernatant in buffer A (200 μl final volume) plus the substrate. Extracellular cathepsins were titrated with E-64 (0–20 nM final) using benzyloxycarbonyl -Phe-Arg-AMC (Z-Phe-Arg-AMC) as substrate (20 μM).

Breakdown of nid-1 from BM Matrix by Cathepsins Secreted into the Cell-free Supernatant

Five micrograms of BM matrix (ECM gel: $\sim$ 61% laminin, 30% type IV collagen, 7% nidogen and a trace of perlecan; Sigma-Aldrich) were incubated alone or with concentrated keratinocyte supernatants (10 μg of protein) containing protease inhibitors (0.5 mM Pefabloc SC, 0.5 mM EDTA, 1 mM MMTS, 0.04 mM pepstatin A) in buffer A or buffer B (except both contain 5 mM DTT instead 2 mM), at 37°C for 24 h. The controls were supernatants that had been incubated for 30 min with E-64 (10 μM) or LHVS (5 μM). Samples were separated by SDS-PAGE (10%) under reducing conditions followed by immunoblot staining with nid-1 polyclonal antibodies. Data from at least three independent experiments were averaged and expressed in percentage of nid-1 hydrolyzed.

BM Matrix Degradation by Murine Spleen Lysates

Spleen lysates from catS knock-out (*ctss*^{-/-}) mice or wild-type (C57/Bl6 background) mice were kind gifts from Drs. M. Guerre-Millo and K. Clément (Inserm U872, Université Pierre et Marie Curie, Paris-6, France). Targeting of mouse catS gene and cell isolation procedures have been described in previous publication

[28]. Both lysates were in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5 plus a cocktail of peptidase inhibitors (1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 0.04 mM pepstatin A, 1 mM MMTS). Their protein concentrations were determined by BCA assays. Cell lysates (10 μg of proteins) were incubated with ECM gel (10 μg) in buffer B (pH 7.4) at 37°C for 18 h. Reaction products were reduced and separated by SDS-PAGE (10%) and the gels were transferred to nitrocellulose membranes for nid-1 immunodetection.

Rheology of the BM Matrix

The viscosity and elasticity of samples of ECM gel (8 mg/ml) alone or ECM that had been incubated with catS (60 nM) in buffer A (pH 5.5) for 36 h at 25°C were measured using a rotational rheometer (ARES, RFS III, TA Instruments, France) according to [29]. The control was ECM that had been incubated with catS inactivated by E-64 (10 μM) samples. The rheometer was equipped with a horizontal plate bearing a cone. Samples (600 μl) were placed between the upper cone and the plate which was heated to 37°C to allow gel formation. Shear experiments were performed on the sample up to 1% strain, with an angular velocity that oscillated sinusoidally. Both viscosity (G') and elasticity (G'') parameters were measured in the linear viscoelastic regimen as a function of the frequency of the angular velocity from 0.1–1 Hz. Data were analysed with TA Orchestrator v 7.2.0.2 software. The integrity of BM components (type IV collagen, laminin, perlecan and nid-1) in the different samples was controlled by immunoblot staining.

Hydrolysis of Nid-1 and Nid-2 by CatS

Samples of nid-1 (143 nM corresponding to 50 ng protein) were incubated with cathepsins B, H, K, L and S (1 nM) in buffer A (pH 5.5) for 0–120 min at 37°C . The experiment was repeated in buffer B (pH 7.4) for 30 min. Samples were separated by SDS-PAGE (10%), and transferred to nitrocellulose membranes for nid-1 immunodetection. They were incubated with polyclonal goat anti-nidogen-1 (1:1000, in PBS 0.1% Tween 20, 5% skim milk powder) overnight at 4°C , washed three times with PBS, and incubated with peroxidase-conjugated anti-goat IgG (Sigma-Aldrich, 1:5000, in PBS 0.1% Tween 20, 5% skim milk powder) for 1 h at room temperature. Nid-1 was visualized using the enhanced chemiluminescence method (Amersham Biosciences, France) according to the manufacturer's instructions and signal densities were measured using the NIH image software (version 1.6.3). The densitometric measurements from three independent experiments were averaged and expressed as the percentage of nid-1 remaining.

Cleavage sites were identified by N-terminal sequencing (Laurent Coquet, Plateforme de Protéomique de l'IFRMP23, Université de Rouen, France). The sequence of human recombinant nid-1 starts with a human CD33 signal peptide (Met⁻²⁵-Ala⁻¹⁰), a poly-histidine sequence (9 $\times$ His) and a L¹SRQE sequence in which Leu corresponds to the first residue of human nid-1.

Mouse nid-1 (50 ng) and its isolated globular domains; G1, G2 and G3 (100 ng) were incubated with catS (10–50 nM) in buffer A at 37°C and aliquots were removed at intervals from 10 to 240 min. Proteolysis products were separated by SDS-PAGE (10% for nid-1; 12% for isolated domains) and detected with the polyclonal anti-nid-1 antibody.

Human nid-2 (1.4 μM) was incubated with cathepsins B, K, L and S (10 nM) in buffer A for 5–60 min at 37°C , and with catS (4 nM) for 0–30 min at 37°C in buffer B; catS inactivated with E-64 was used as control. Proteins were separated by SDS-PAGE (10%) under reducing conditions and transferred to nitrocellulose

membranes. Nid-2 was immunodetected by western blot, using a goat-anti-nid-2 antibody (1:1000) and an anti-goat IgG-peroxidase conjugate (1:5000) and quantified as described above.

Hydrolysis of isolated basement membrane constituents and reconstituted BM matrix by cathepsins B, K, L and S

Cathepsins B, K, L and S (10–100 nM) were incubated with laminin-211/221 (3.5 µg), type IV collagen (12 µg), perlecan (3 µg), and fibronectin (5 µg) for 4 h at 37°C in buffer A. Cathepsins that had been incubated with the specific cysteine protease inhibitor E-64 (1 µM) were used as controls. Cathepsins B, K, L and S (10–200 nM) were incubated for 4 h at 37°C with 60 µg ECM gel in buffer A. As controls, cathepsins preincubated with E-64 (1 µM) for 30 minutes were used. Reactions were stopped by adding Laemmli sample buffer and proteins were separated by SDS-polyacrylamide electrophoresis on 10% gels. The gels were stained with Coomassie blue.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assays

Laminin-211/221, type IV collagen and perlecan (500 ng) in 50 mM sodium carbonate-bicarbonate buffer, pH 9.6 were immobilized on the surface of plastic microtiter wells (Nunc, VWR, International, Pessac, France) by incubation overnight at 4°C. Non-specific binding sites were blocked with PBS containing 2% BSA (Sigma-Aldrich). Nid-1 (0–250 ng) prepared in buffer A (pH 5.5) was placed in each well and the plate was incubated for 3 h at room temperature. The wells were then incubated with goat anti-nid-1 antibody (1:500), followed by anti-goat IgG-peroxidase conjugate (1:10000), then 0.04% (v/v) H₂O₂ and orthophenylene diamine (0.4 mg/ml) in substrate buffer (50 mM phosphate, 20 mM citric acid, pH 5.5). The reaction was stopped with 3 M H₂SO₄. Absorbance was measured at 492 nm in a plate reader (VersaMax, Molecular Devices, St Grégoire, France). Similar experiments were performed with fragments of nid-1. Briefly, nid-1 (25 ng) was incubated with catS (5 nM) in buffer A or buffer B for 5–60 min and hydrolysis was stopped by adding E-64 (100 nM). Samples of the reaction mixture were then placed in the wells of 96-well plates that were coated with ligand (laminin-211/221, type IV collagen and perlecan) and interactions were monitored as for intact nid-1.

Surface Plasmon Resonance (SPR) Assays

The binding of nid-1 to laminin-211/221, type IV collagen and perlecan was measured by SPR using the BIAcoreTM T100 system (BIAcore, GE Healthcare Europe GmbH, France). Nid-1 (20 µg/mL) was immobilized on the CM5 sensor chip by the carbodiimide coupling procedure at a flow-rate of 5 µl/min. The surface of the carboxymethylated sensor chip was activated by adding 0.2 M 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimidehydrochloride) and 0.05 M N-hydroxysuccinimide. The nid-1 coupled to the activated chip in 10 mM sodium acetate pH 4.0 provided 1500 resonance units (RU). Residual activated esters were blocked with 1 M ethanolamine pH 8.5. For controls, one surface was activated and blocked under identical conditions without coupling nid-1. The binding of nid-1 to various ligands (laminin-211/221, 25 µg/mL; type IV collagen, 80 µg/mL and perlecan, 10 µg/mL) was studied in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4, with 0.05% Tween 20 at a flow-rate of 10 µl/min for 3 min. CatS (0–50 nM), or cathepsins B, K, L (10 nM) in 10 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7.4, with 0.05% Tween 20 containing 2 mM DTT were injected at the same flow-rate for 3 min, followed by a dissociation phase of 3 min. The controls were buffer or heat-inactivated catS, injected as the second ligand.

Bound ligands were removed from the immobilized protein with 0.01 M NaOH and 1 M NaCl was used to regenerate the chip.

Statistical Analysis

Statistical differences between two groups were calculated using Student's one-way t-test followed for keratinocytes migration, nid-1 and nid-2 breakdown and for ligand binding assays. Data from western blot analysis of nid-1 and nid-2 and BM components are expressed as means ± S.D of three separated experiments. A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant (*, *P* < 0.05; **, *P* < 0.01).

Results

Expression and Involvement of Cathepsins B, K, L, S in the Migration of Keratinocytes through a Reconstituted BM

The dermal-epidermal junction (DEJ) zone of biopsies of European descent healthy skin (Fig. 1A) contained type IV collagen, laminins (the major isoforms in skin BM are laminin-332 and laminin-511), nid-1, and nid-2 in a typical linear-interrupted pattern. The dermal blood vessels also contained these proteins, but they were not detected in keratinocytes (nuclear DAPI staining). CatB was detected in keratinocytes throughout the epidermal layers, as reported by Brix et al. [30]. The stratum basale, spinosum and granulosum contained intense catB immunoreactivity, but the stratum corneum was only faintly stained. CatB was found in the vesicles of the perinuclear region of proliferative keratinocytes (stratum basale), while catB was more broadly distributed throughout the upper layers (stratum spinosum and granulosum). The pattern of catK staining in the epidermis showed intense staining in the stratum corneum and stratum basale. CatL was found in keratinocytes in all epidermal layers except the stratum corneum. Like catB, catS was detected in all layers of the epidermis, particularly in the stratum spinosum and stratum basale. CatS was mainly detected in keratinocytes and in cellular protrusions between keratinocytes, with prolonged extensions close to the BM (Fig. 1A). In parallel, both pro- and mature forms of cathepsins B, K, L and S were detected by immunoblot staining in whole epidermis extract from human skin (Fig. 1B). Intermediate bands correspond to uncompleted maturation. We next identified the extracellular cathepsins produced by human keratinocytes, prior to evaluating their role in BM hydrolysis. Similarly, their concentrated cell-free supernatants revealed the presence of both zymogens and mature forms of cathepsins B, K, L and S (Fig. 1C). The presence of pro-cathepsins in the culture medium supports the concept that keratinocytes secrete cathepsins that can be autocatalytically activated [31]. Similar results were obtained with the immortalized HaCaT cells (data not shown). The total cysteine cathepsin activities in the conditioned media of cultures of primary keratinocytes (112 ± 1 nmol/g protein) and HaCaT cells (79 ± 1 nmol/g protein) were similar and accounted for ~10% of the active concentrations measured in whole cell lysates.

The relative contribution of cathepsins in BM hydrolysis was investigated using a cell migration assay through a reconstituted BM matrix, (mimicking the natural BM secreted by adherent cells), using the broad spectrum cysteine cathepsins inhibitor E-64. Inhibition of cysteine cathepsins by E-64 impaired significantly keratinocytes migration (38 ± 5%, *P* < 0.01) through transwell chambers coated with BM matrix (Fig. 1D). Similar results were obtained with the membrane permeable E-64d (data not shown). This strongly suggests that human cysteine cathepsins mediate BM matrix degradation and promote with other identified proteases

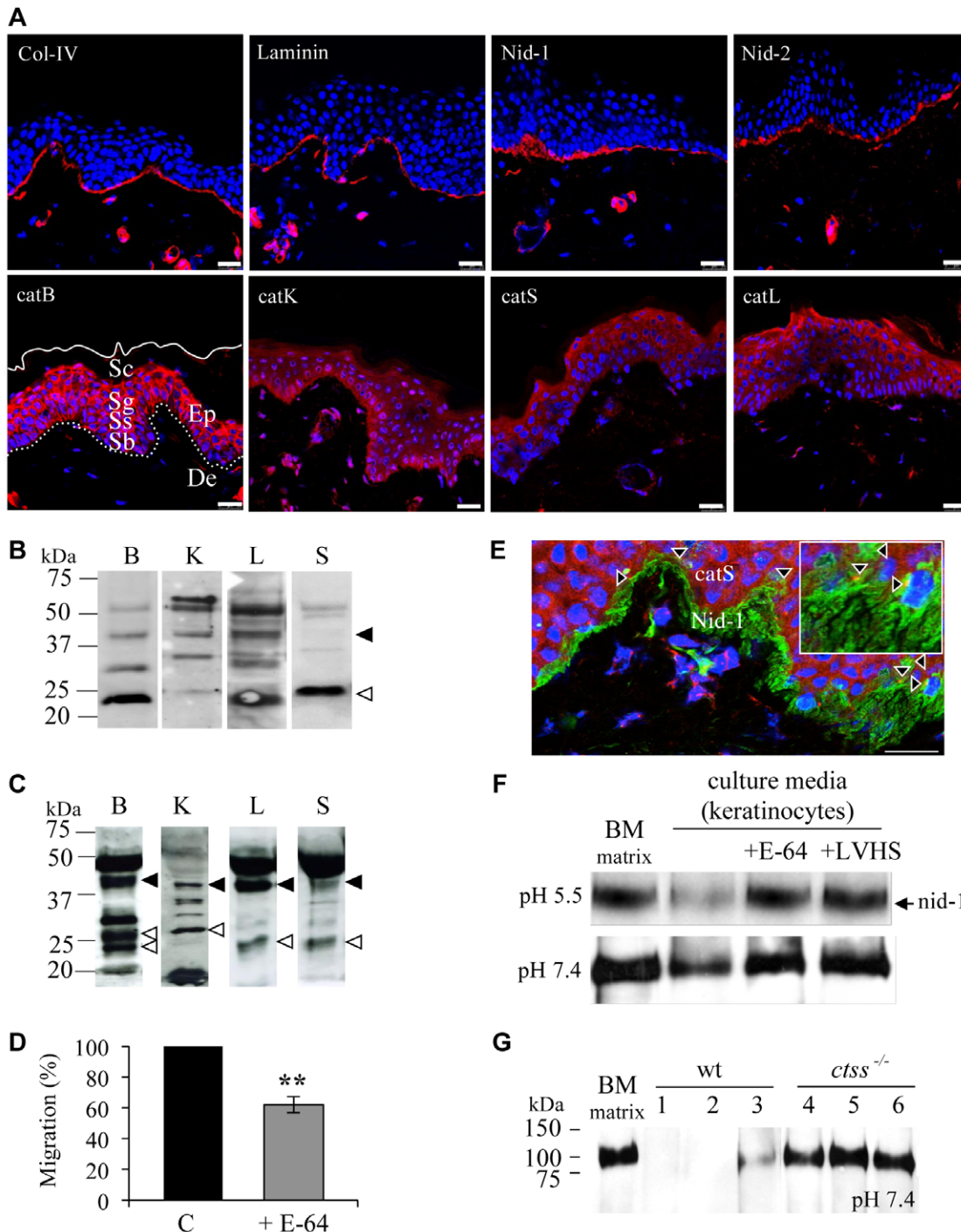


Figure 1. Major BM components and cysteine cathepsins B, K, L, S in the epidermis of human skin. (A) Immunofluorescence labeling of major BM components (type IV collagen, laminin, nid-1 and -2) and cathepsins B, K, L, S. The nuclei of keratinocytes were stained with DAPI. Ep: epidermis; De: dermis; Sc: stratum corneum; Sg: stratum granulosum; Ss: stratum spinosum; Sb: stratum basale. The continuous line indicates the outermost layer of the skin, the dashed line indicates the basal lamina. Bars correspond to 25 μ m. (B) Expression of pro- and mature cathepsins B, K, L and S in human skin epidermis. The dark arrow indicates the proform of cathepsin and the light arrow indicated the mature form. Intermediate bands correspond to uncompleted maturation. (C) Samples of conditioned culture medium of human primary keratinocytes were concentrated (x 200), separated (100 μ g protein) by SDS-PAGE (15%) under reducing conditions. (D) Transwell BM matrix migration assays (n = 5 separate experiments) by keratinocytes (C: control) treated with E-64 (**, $P < 0.01$ when compared to control). (E) Double immunofluorescent labeling of catS and nid-1 in human skin and confocal laser microscopy analysis. Secondary antibodies were Alexa Fluor 546 anti-goat (catS: red) and Alexa Fluor 488 anti-mouse (nidogen-1: green). Magnification (insert) of the lower panel of the image (x 3). Arrowheads indicate cells containing catS and nid-1 close together (yellow). Scale bar = 25 μ m. (F) BM matrix (5 μ g) was incubated alone or with concentrated keratinocyte supernatant (10 μ g protein) at pH 5.5 or 7.4 for 24 h. For controls, supernatants were pre-incubated for 30 min with E-64 or LHSV. Data represent immunoblot analysis with nid-1 antibodies from at least 3 independent experiments. (G) Pretreated lysates (10 μ g) of wild-type C57/BL6 mouse spleen (wt, lysates: 1–3) and catS-deficient spleen (*ctss*^{-/-}, lysates: 4–6) were incubated (pH 7.4, 37°C) for 1 h in order to inactivate all cysteine cathepsins, except catS. BM matrix (10 μ g) was then

incubated alone or with cell lysates (pH 7.4, 37°C) for 18 h. Immunoreactive nid-1 was revealed by western blot. Assays were performed on different samples ($n=15$), which yielded similar results and a representative of two independent experiments is presented.
doi:10.1371/journal.pone.0043494.g001

cell migration. Double immunofluorescence staining indicated that the distribution of catS is adjacent to nid-1 throughout the BM and its appendages in human skin biopsies (Fig. 1E). Higher magnifications showed that the staining of catS partly overlapped with that of nid-1, suggesting that the enzyme interacted with nid-1 in the vicinity of the BM. We then analyzed the contribution of catS secreted by human keratinocytes to the cleavage of nid-1 in BM matrix. Since catS is the only cathepsin that remains active after prolonged exposure to neutral pH, assays were performed at both pH (5.5 and 7.4). BM matrix incubated for 24 h with concentrated conditioned culture medium at pH 5.5 had lost almost all their nid-1 ($90\pm0.5\%$, $p<0.01$) (Fig. 1F) and two thirds of their nid-1 ($69\pm6.6\%$, $p<0.01$) when incubated at pH 7.4. Supernatants whose cathepsins had been irreversibly inactivated with morpholinourea-Leu-Hph-vinyl-sulfone (LHVS) or E-64 did not hydrolyze nid-1. The proteolysis of nid-1 by extracellular cathepsins at both acidic and neutral pH was confirmed with HaCaT cells as well (data not shown). However, nid-1 was not hydrolyzed by pretreated spleen lysates from catS-deficient mice (*ctss*^{-/-}) at pH 7.4 confirming the specific involvement of catS among the cathepsins tested (Fig. 1G). Western blot of BM matrix with an anti-nidogen-1 antibody showed that the ~90 kDa band is the major form of nid-1 in the commercial BM matrix extract (ECM gel, Sigma-Aldrich). It has to be noticed that the 150 kDa form of unprocessed nid-1 is known to be highly susceptible to endogenous proteolysis (particularly within its N-terminal domain G1) during pre-extraction tissue and that N-terminally cleaved form of ~90 kDa nid-1 was already described in other murine BM tissues extracts. However, G2 and G3 domains are conserved and still bind to BM partners (type IV collagen, laminins, perlecan, fibulins) [11]. Experiments were also performed with an isolated nidogen/laminin complex from EHS. Western blots showed that catS cleaved readily higher forms of nid-1 (~120 kDa, ~150 kDa and ~195 kDa) after 1 h incubation at pH 5.5 (data not shown). In addition, catS degraded efficiently, in a dose-dependent manner soluble preparations of major BM constituents: laminin-211/221, type IV collagen, perlecan, fibronectin and the BM matrix extract (Fig. S2A, B). All these results support that catS may participate with other proteases in the hydrolysis of major components of BM.

Alteration of BM Matrix Viscoelastic Properties by CatS

We investigated the influence of catS on the mechanical properties (elasticity and viscosity) of the BM extract by rheological analysis (Fig. 2A). Matrix (ECM gel alone or incubated with catS) was subjected to small amplitude oscillatory shearing and G' (elasticity) and G'' (viscosity) moduli were recorded as a function of the frequency. Gelified ECM gel (8 mg/ml) had a typical solid material-like profile; the G' modulus was greater than the G'' modulus throughout the frequency range, and were similar to the values for Matrigel (another commercial source of BM extract from EHS), at the same concentration [29]. CatS reduced both moduli (elasticity and viscosity) by one-half, but heat-inactivated catS did not alter either property (data not shown). Immunoblot analysis confirmed that these alterations in the visco-elastic properties of the BM were due to the hydrolysis of nid-1 as well as other major constituents including type IV collagen, laminins, and perlecan (Fig. 2B).

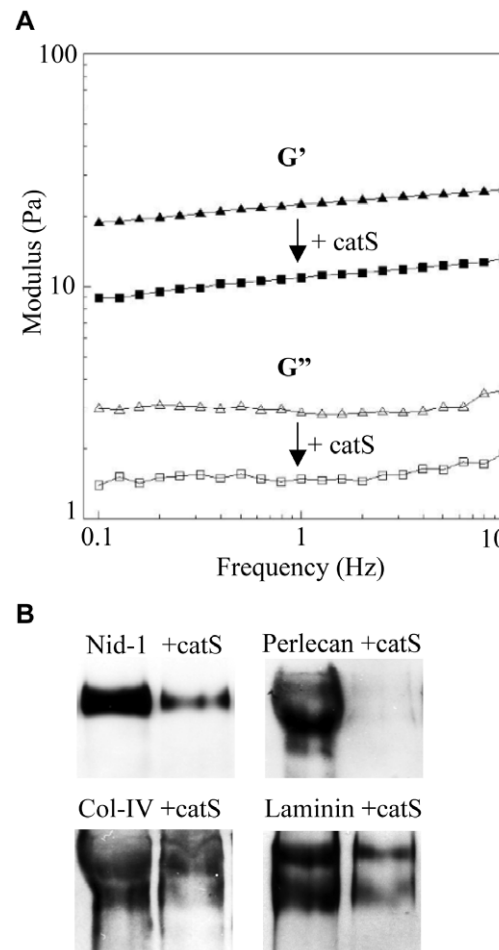


Figure 2. Influence of catS on the visco-elastic properties of BM matrix. (A) G' (elasticity: black symbol) and G'' (viscosity: white symbol) moduli of BM matrix (ECM gel: 8 mg/ml) without (C: control, triangles), or with catS (60 nM, squares) were determined by rheometry. A representative of three independent experiments is shown. (B) Western blot analysis of major BM constituents of ECM gel (nid-1, perlecan, laminin and collagen IV) with or without catS.
doi:10.1371/journal.pone.0043494.g002

Identification of Cleavage Sites of Recombinant Nid-1 by CatS

CatS (1 nM) cleaved 50% of nid-1 within 15 min and to 100% in 2 h resulting in one major fragment of ~34 kDa and a minor of ~49 kDa (Figs. 3A, 3C). Cathepsins B, L and K were less efficient (enzyme:substrate ratio = 1:143, w/w); undigested nid-1 still remained after incubation for 2 h (Fig. 3A). CatL cleaved ~35% of nid-1 in 4 h (data not shown). Unlike other cathepsins, catS also hydrolyzed nid-1 at neutral pH (40% of nid-1 was cleaved after 30 min and 75% cleaved after 120 min) (Fig. 3B). Sequencing the N-terminals of hydrolysis products identified the main cleavage sites ($\rightarrow$) of nid-1 as LLPL⁴⁵⁹ ↓ APVG (within the central part of the G2 domain), HERE⁶⁹³ ↓ HILG (in the thyroglobulin-like domain) and RQDL⁸⁵⁹ ↓ GSPE (at the N-terminal part of the G3 domain) (Fig. 3D). Some bands (*) gave no interpretable results (Fig. 3C). Western blot analyses of the catS mediated hydrolysis of

recombinant human and mouse nid-1 (Fig. 3E), which is more resistant to proteolysis [11], revealed significant differences. CatS digests of mouse nid-1 contained only four major bands while numerous fragments were detected in the human nid-1. We also digested the recombinant globular domains (G1 to G3) of mouse nid-1 with catS (Fig. 3F). The mouse G2 domain appeared to be the most resistant to proteolysis, probably due to the presence of a N-glycosylation site that is absent in human nid-1 [32]. The G1 and G3 domains were completely hydrolyzed after incubation with catS for 4 h, but approximately 30% of the G2 domain remained intact at this time.

Hydrolysis of Recombinant Nid-2 by CatS

Nid-2 (200 kDa) is longer than nid-1, and there are significant differences in their link and rod domains. Its sequence is 46% identical to that of nid-1. The two nidogen isoforms have similar structures and the same modular structure of three globular domains (G1–G3) [33]. We therefore evaluated the sensitivity of human nid-2 to proteolysis by catS (Fig. 4). CatS was by far the most efficient cathepsin tested at cleaving nid-2 after 30 min incubation, at pH 5.5 (Fig. 4A). Like nid-1, nid-2 was readily cleaved by catS at pH 5.5, while 30% of nid-2 remained uncleaved at neutral pH (Fig. 4B). Our results therefore show that both nidogen isoforms are susceptible to proteolysis by catS.

CatS and the Binding Properties of Human Nid-1

We analysed the binding of soluble nid-1 to laminin-211/221, type IV collagen and perlecan using an enzyme-linked immunosorbent assay with anti-nidogen-1 (Fig. 5). Nid-1 was bound to each of the immobilized ligands in a concentration dependent manner (Fig. 5A). The dose-response profiles were all similar, despite its apparently higher affinity for laminin-211/221. The half-maximal reactions occurred around 1–2 nM nid-1, in agreement with the apparent dissociation constant, K_d [34]. Previous studies showed that human nid-1 had weaker affinities for collagen IV and perlecan than for laminin [11]. We next examined the binding of a mixture of nid-1 fragments produced by incubation with catS (Fig. 3C) to immobilized ligands. The nid-1 bound to laminin-211/221 and type IV collagen had decreased >3-fold after incubation for 60 min (Fig. 5B) but the binding to perlecan had decreased only 1.6-fold, probably due to its contamination with laminin during the extraction procedure, as described elsewhere (1–2.5%) [35]. The binding patterns at pH 7.4, were similar, although the interactions between nid-1 and its ligands were weaker. Despite an identical molarity of both buffers, the ionic strength of sodium phosphate buffer (0.265 M) is different to that observed at pH 5.5 (0.087 M) (theoretical values were obtained by using a free software developed by Rob Beynon: www.liv.ac.uk/buffers/buffercalc.html) (Fig. 5C). A such difference may therefore affect nidogen-1 binding to BM partners. Thus, the hydrolysis of nid-1 by catS generates fragments that bind to immobilized laminin-211/221, collagen IV and perlecan significantly more weakly than does intact nid-1.

Interactions of Nid-1 with its BM Partners in the Presence of CatS

Surface plasmon resonance analysis of the binding of immobilized nid-1 to laminin-211/221, type IV collagen, and perlecan at pH 7.4 gave typical association curves (Fig. 6). Nid-1 bound type IV collagen less strongly than either laminin-211/221 or perlecan. Addition of catS immediately decreased the resonance unit (RU) in a dose-dependent manner (a 50% decrease within 1 min). CatS completely dissociated at pH 7.4 the nid-1-laminin-211/221 and

nid-1-type IV collagen complexes, in agreement with the ligand binding assays but not the nid-1-perlecan complexes. No decrease in RU signal was measured in presence of buffer or heat-inactivated catS. There was a small increase in the RU signal when heat-inactivated catS was added to complexes of nid-1 and laminin-211/221, collagen IV or perlecan (data not shown). This suggests that catS may interact with BM proteins, as do cathepsins B and L [36,37]. Cathepsins B, L and K did not modify the binding of nid-1 to the other BM proteins at pH 7.4 (data not shown).

Discussion

While numerous studies have shown that catS takes part in intracellular and extracellular processes, most of its specific biological substrates have not been completely characterized [16]. The high elastinolytic and collagenolytic activities of catS and its proteolytic activity at neutral pH indicate that catS can disrupt BM assembly [20,38]. Despite the pH gradient from the stratum basale (pH 7.4) of the epidermis to the outer stratum corneum (pH 4.5) [39], cells may produce vacuolar-type H^+ -ATPase to acidify the pericellular space, so triggering cysteine cathepsin activity [31]. Immunofluorescence studies showing catS-positive vesicles in the epidermis, particularly in the stratum basale, suggest that catS contributes to the *in situ* degradation of BM constituents and particularly nid-1, a key protein with perlecan in the formation, organization, and stabilization of the epidermal BM [40].

We have shown that catS hydrolyzes readily major BM components: type IV collagen, laminin-211/221, perlecan, fibronectin, and particularly nid-1 and nid-2, more efficiently than all other cysteine cathepsins tested. The fact that catS readily hydrolyzes both nidogen isoforms adds support for its role in BM degradation in specific organs. We have also identified new critical sites in the G2 and G3 domains of human nid-1 whose cleavage abolishes the capacity of nid-1 to bind to other BM proteins. These two domains are essential for the formation of ternary complexes between major BM components [4]. The major one encompasses the first epidermal growth factor (EGF) repeat, which contains an RGD sequence that interacts with many integrin receptors, in the connecting rod-like domain. The second RGD independent attachment site lies in the cysteine-rich EGF repeat of the G2 domain. The proteolytic cleavage in the thyroglobulin type-1 region (Tg-1) of the nid-1 rod domain is rather surprising, since some Tg-1 domains (equistatin, testican-1), despite their amino acid sequence similarity, can inhibit several classes of proteinases, including cysteine cathepsins and aspartic cathepsin D [8,41]. However, certain Tg-1 domains can also be good substrates for some cathepsins, due to steric hindrance between the Tg-1 domain and the active site of the enzyme [42]. In addition, the testican-1 Tg-1 domain exhibits both features with its target cysteine cathepsins [43]. Indeed, among proteases tested only cathepsins K and L cleaved the Tg-1 domain of testican-1. An important characteristic of Tg-1 domain of testican-1 is its selectivity in inhibiting only catL while other enzymes tested were not affected (papain, cathepsins B, K, S, X, cathepsin D and trypsin). Further, entactin (also known as nidogen) was shown to exhibit no apparent inhibitory activity against papain [44]. The widely distributed Tg-1 domains may have other features than peptidase inhibition, like the Tg-1 domains of the insulin-like growth factor binding protein-6 (IGFBP-6) which were shown to be involved in the binding of IGFs [45]. Thus, the physiological function of the Tg-1 motif of nidogen-1 towards proteases remains to be explored. Impairment in the nid-1 site (G3 domain) that

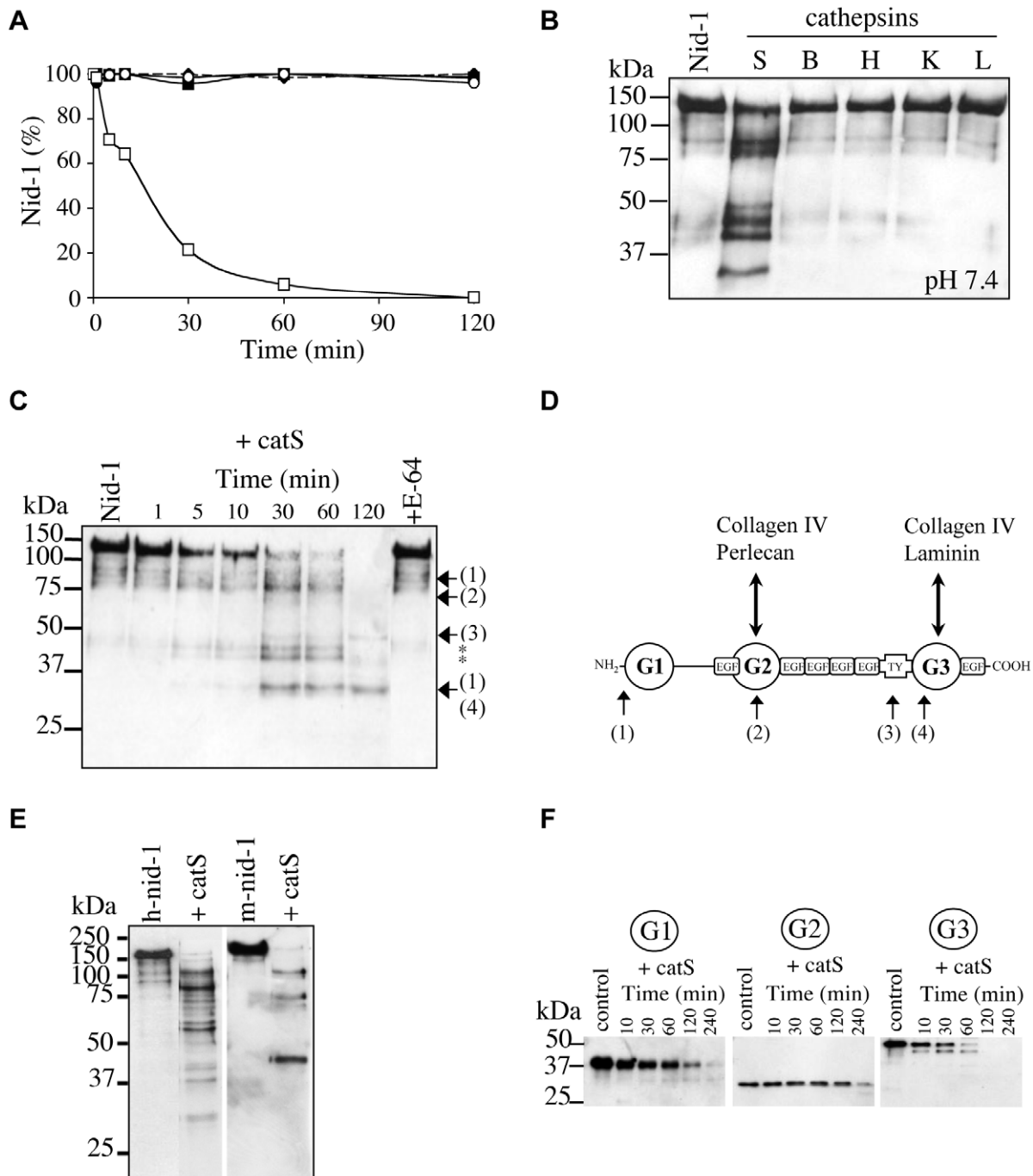


Figure 3. Proteolysis of recombinant nid-1 by catS and location of the cleavage sites. (A) Hydrolysis (0–120 min) of human nid-1 by cathepsins B (●), L (○), K (◆), H (■) and S (□). Nid-1 was incubated with each cathepsin at pH 5.5 (enzyme:substrate ratio = 1:143, w/w). Residual nid-1 was quantified by densitometry. (B) Hydrolysis of human nid-1 by cathepsins B, H, K, L and S at pH 7.4 for 30 min (enzyme:substrate ratio = 1:143, w/w). (C) Human nid-1 (50 ng) was incubated with catS (1 nM) at pH 5.5. Fragments were identified by N-terminal sequencing and their positions in the nid-1 sequence (1–4) are indicated. Asterisks indicate N-terminal fragments for which no sequence was obtained. (D) Diagram showing the nid-1 domains and location of protein binding sites. CatS cleavage sites are indicated as: (1) corresponds to the N-terminal sequence ^{25} MPLLLL of rec. human nid-1; (2) corresponds to ^{460} APVGGI; (3) corresponds to ^{694} HXLGAA and (4) corresponds to ^{860} XXPEGI where X stands for unidentified residues. (E) Hydrolysis of human and mouse nid-1 (50 ng) by human catS (10 nM) at pH 5.5; incubation for 10 min. (F) Recombinant mouse G1 domain (100 ng) was incubated with catS (50 nM) at pH 5.5 for 10, 30, 60, 120 and 240 min. Similar assays were performed with mouse G2 and G3 domains. Anti-nid-1 antibody was used for western blot analysis. doi:10.1371/journal.pone.0043494.g003

binds laminin inhibits BM formation in human skin-organotypic cocultures and the growth and branching morphogenesis of lung and kidney epithelial cells [46,47]. Our results suggest that catS

may interfere with BM network by cleaving the sites on nid-1 by which it binds to BM partners.

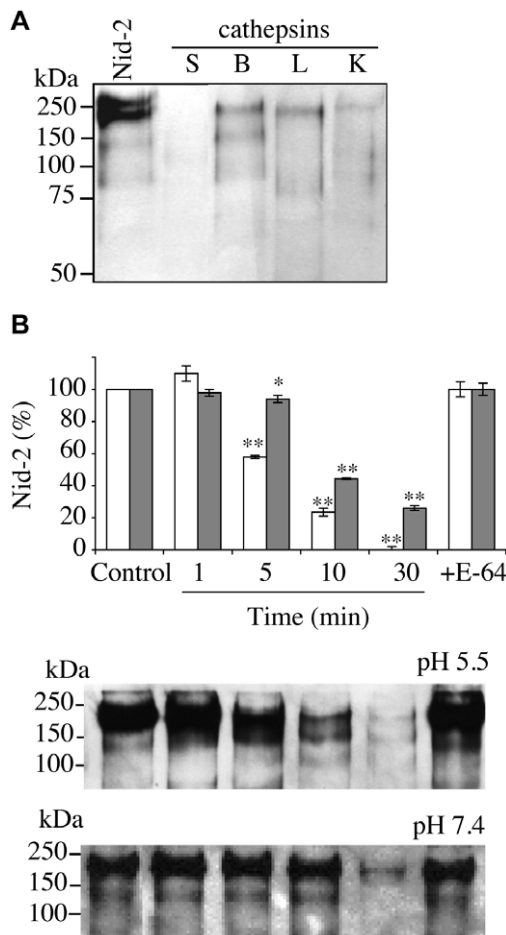


Figure 4. Hydrolysis of nid-2 by catS. (A) Western-blot of human nid-2 incubated with catS, catB, catL and catK at pH 5.5 for 30 min (enzyme:substrate ratio = 1:143, w/w). (B) Densitometry analysis of nid-2 after incubation with catS (1, 5, 10, 30 min) at pH 5.5 (white bar) and pH 7.4 (grey bar). E-64 inactivated catS was used as a control. The percentage of residual nid-2 was expressed as means $\pm$ S.D (*, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ when compared to control). A representative of three independent western blots at both pH is shown. doi:10.1371/journal.pone.0043494.g004

Other proteases, including serine proteases such as leukocyte elastase and MMPs, can also cleave nid-1 [12,48,49]. They mainly cleave nid-1 at two sites, one is within the flexible linker between the G1 and G2 domains and the other in the G3 globular domain, to generate stable fragments of 110 kDa and 100 kDa that have different laminin-binding activities [48]. Though free nid-1 is highly susceptible to proteolysis, it seems to be less sensitive when it is complexed with other BM [11,48,50]. However, our data shown that catS still rapidly hydrolyzes nid-1, even when it is complexed with laminins, type IV collagen or perlecan. Furthermore, catS efficiently and specifically cleaved nid-1 from a murine tumor-derived BM extract or from normal human placenta (data not shown), at both acidic and neutral pH, while its degradation is hampered in spleen lysates from *ctss*^{-/-} mice, pretreated with inhibitors of other classes of proteases. Rheological measurements show that disrupting the network that nid-1 forms with other BM components by catS causes the mechanical features (elasticity and viscosity) of a reconstituted BM matrix to collapse. Our studies show for the first time that cysteine cathepsins, particularly catS, secreted by human keratinocytes participate with other identified

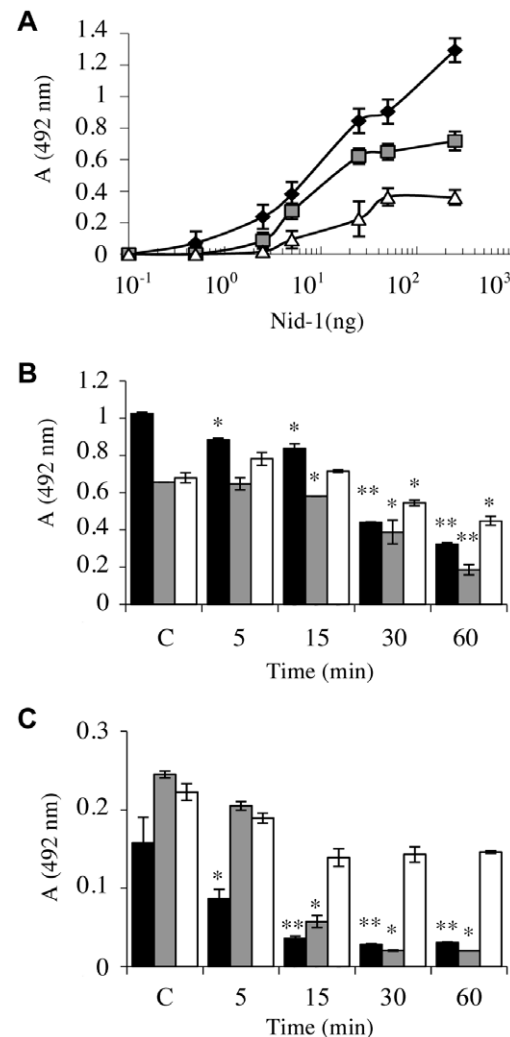


Figure 5. Influence of catS on nid-1 binding to BM constituents. (A) ELISA results showing the binding at pH 5.5 of undigested nid-1 (0–250 ng) to immobilized ligands (500 ng): laminin-211/221 (black diamond), collagen IV (dark grey square) and perlecan (white triangle). (B) ELISA results showing the binding at pH 5.5 of nid-1 (25 ng) pre-incubated with catS (5 nM) for 5–60 min to immobilized ligands (500 ng): laminin-211/221 (black bar), collagen IV (dark grey bar) and perlecan (white bar). Controls were performed using undigested nid-1 (25 ng) at pH 5.5. (C) The same experiment was repeated at pH 7.4. Experiments were performed three independent times (*, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ when compared to control). doi:10.1371/journal.pone.0043494.g005

classes of proteases in the proteolysis of nid-1 extracted from the BM. Fleischmajer et al. proposed that keratinocytes regulate the accumulation of nid-1 at the DEJ zone by inhibiting nid-1 synthesis or by activating proteolytic enzymes to degrade it [51]. As catS is regarded as a potent matrix remodeling protease, the degradation of nidogen is likely. However, the physiological relevance of nidogen hydrolysis by catS has never been explored and should be subject of further investigations. Nonetheless, loss of laminin, nidogens and structural disorganization observed in Sjögren's syndrome (SS) [52] may in part attributable to cysteine cathepsins, and particularly to catS, which expression is up-regulated and activity is increased in the tears of NOD mice, a model of SS [53].

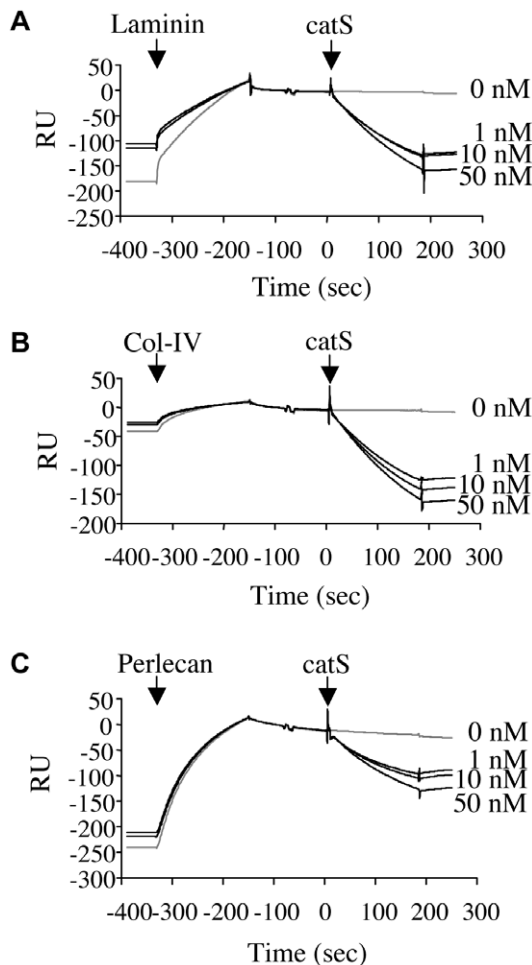


Figure 6. Dynamic analysis of catS activity on nid-1 complexes by surface plasmon resonance. Sensorgrams of SPR analysis show the binding of intact laminin-211/221 (A), collagen IV (B) or perlecan (C) to immobilized nid-1. Stable complexes were incubated with catS (1–50 nM) added at $t = 0$ sec.
doi:10.1371/journal.pone.0043494.g006

Supporting Information

Figure S1 Selectivity of human cathepsins B, K, L and S antibodies. (A) Immunoblots of purified human cathepsins B, K,

References

- Breitkreutz D, Miranica N, Nischt R (2009) Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions? *Histochem. Cell Biol* 132: 1–10.
- Hynes RO (2009) The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 326: 1216–1219.
- Kruegel J, Miosge N (2010) Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell. Mol. Life Sci* 67: 2879–2895.
- Ho MSP, Böse K, Mokkapati S, Nischt R, Smyth N (2008) Nidogens-Extracellular matrix linker molecules. *Microsc. Res. Tech* 71: 387–395.
- 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.
- Fowlkes JL, Thraill KM, George-Nascimento C, Rosenberg CK, Serra DM (1997) Heparin-binding, highly basic regions within the thyroglobulin type-1 repeat of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins (IGFBPs) -3, -5, and -6 inhibit IGFBP-4 degradation. *Endocrinology* 138: 2280–2285.
- Lenarcic B, Bevec T (1998) Thyroglobulin-type-1 domains inhibit papain-like cysteine proteinase inhibitors. *Biol. Chem.* 379: 105–111.
- 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.
- Paulsson M, Deutzmann R, Dziadek M, Nowack H, Timpl R, et al. (1986) Purification and structural characterization of intact and fragmented nidogen obtained from a tumor basement membrane. *Eur. J. Biochem* 156: 467–478.
- Sires UI, Griffin GL, Broekelmann TJ, Mecham RP, Murphy G, et al. (1993) Degradation of entactin by matrix metalloproteinases. Susceptibility to matrilysin and identification of cleavage sites. *J. Biol. Chem* 268: 2069–2074.
- Mayer U, Zimmermann K, Mann K, Reinhardt D, Timpl R, et al. (1995) Binding properties and protease stability of recombinant human nidogen. *Eur. J. Biochem* 227: 681–686.
- Gronski TJ Jr, Martin RL, Kobayashi DK, Walsh BC, Holman MC, et al. (1997) Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. *J. Biol. Chem* 272: 12189–12194.
- Titz B, Dietrich S, Sadowski T, Beck C, Petersen A, et al. (2004) Activity of MMP-19 inhibits capillary-like formation due to processing of nidogen-1. *Cell. Mol. Life Sci* 61: 1826–1833.
- Dziadek M, Clements R, Mitrangas K, Reiter H, Fowler K (1988) Analysis of degradation of the basement membrane protein nidogen, using a specific monoclonal antibody. *Eur. J. Biochem* 172: 219–225.
- Mohamed MM, Sloane BF (2006) Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6: 764–775.

L and S. (B) Human keratins from epidermis (proteins of 50–70 kDa) were transferred to nitrocellulose membrane and immunodetected by polyclonal anti-keratin. No cross reactivity was observed with anti-cathepsins B, K, L and S antibodies. (TIF)

Figure S2 Comparative efficiencies of cathepsins B, S, K and L to degrade major BM constituents. (A) Type IV-collagen (12 μ g) was incubated in the absence or in the presence of cathepsins B, S, K and L (50–100 nM) in buffer A during 4 h. Similar assays were performed with laminin-211/221 (3.5 μ g), perlecan (3 μ g) and fibronectin (5 μ g). As a control, each cathepsin (100 nM) was pre-incubated 30 min with the cysteine protease specific inhibitor E-64 (100 μ M). Samples were loaded and separated by SDS-PAGE (10%) under reducing conditions. Gels were stained with Coomassie Blue. Percentages of residual BM proteins in the presence of cathepsins are shown $\pm$ S.E.D. (B) BM matrix from EHS mouse sarcoma (ECM gel, 8 mg/ml) was incubated with cathepsins B, S, K and L (10–200 nM) at pH 5.5 for 4 h at 37°C. For controls, each cathepsin (200 nM) was incubated with E-64 (1 μ M) before adding it to the BM extract. (TIF)

Acknowledgments

We thank Dr. Alex Poulin (LVMH Recherche) for rheology studies, Laurent Coquet (Plateforme de Protéomique de l'IFR MP23, Université de Rouen, France) for N-terminal peptide sequencing, Dr. Sylvie Canepa (Physiologie de la Reproduction et des Comportements, UMR INRA 0085 - UMR CNRS 7247, Nouzilly, France) for support the SPR studies, Drs. M. Guerre-Millo and K. Clément (INSERM U872, Paris, France) for their kind gift of spleen lysates from wild-type and *ctss*^{-/-} mice and Stéphane Beauclercq for his technical help. The English text was edited by Dr. Owen Parkes.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JS EL-N CN GL FL. Performed the experiments: JS EL-N. Analyzed the data: JS EL-N CN RK GL FL. Contributed reagents/materials/analysis tools: TS SS EP DB. Wrote the paper: FL.

16. Small D, Burden R, Scott C (2011) The Emerging Relevance of the Cysteine Protease Cathepsin S in Disease. *Clin. Rev. Bone Miner. Metab* 9: 122–132.
17. Wolters PJ, Chapman HA (2000) Importance of lysosomal cysteine proteases in lung disease. *Respir. Res* 1: 170–177.
18. Lecaille F, Kaleta J, Brömme 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.
19. Reiser J, Adair B, Reinheckel T (2010) Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J. Clin. Invest* 120: 3421–3431.
20. Shi G-P, Sukhova GK, Kuzuya M, Ye Q, Du J, et al. (2003) Deficiency of the cysteine protease cathepsin S impairs microvessel growth. *Circ. Res* 92: 493–500.
21. Linnevers CJ, McGrath ME, Armstrong R, Mistry FR, Barnes MG, et al. (1997) Expression of human cathepsin K in *Pichia pastoris* and preliminary crystallographic studies of an inhibitor complex. *Protein Sci* 6: 919–921.
22. Barrett AJ, Kembhavi AA, Brown MA, Kirschke H, Knight CG, et al. (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.
23. Fox JW, Mayer U, Nischt R, Aumailley M, Reinhardt D, et al. (1991) Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO J* 10: 3137–3146.
24. Ries A, Göhring W, Fox JW, Timpl R, Sasaki T (2001) Recombinant domains of mouse nidogen-1 and their binding to basement membrane proteins and monoclonal antibodies. *Eur. J. Biochem* 268: 5119–5128.
25. Schönefuss A, Wendt W, Schattling B, Schulten R, Hoffmann K, et al. (2010) Upregulation of cathepsin S in psoriatic keratinocytes. *Exp. Dermatol* 19: e80–88.
26. Zuliani T, Denis V, Noblesse E, Schnebert S, Andre P, et al. (2005) Hydrogen peroxide-induced cell death in normal human keratinocytes is differentiation dependent. *Free Radic. Biol. Med.* 38: 307–316.
27. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, et al. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* 106: 761–771.
28. Shi GP, Villadangos JA, Dranoff G, Small C, Gu L, et al. (1999) Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* 10: 197–206.
29. Van Goethem E, Poincloux R, Gauffre F, Maridonneau-Parini I, Le Cabec V (2010) Matrix architecture dictates three-dimensional migration modes of human macrophages: differential involvement of proteases and podosome-like structures. *J. Immunol* 184: 1049–1061.
30. Büth H, Wolters B, Hartwig B, Meier-Bornheim R, Veith H, et al. (2004) HaCaT keratinocytes secrete lysosomal cysteine proteinases during migration. *Eur. J. Cell Biol* 83: 781–795.
31. Punturieri A, Filippov S, Allen E, Caras I, Murray R, et al. (2000) Regulation of elastolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages. *J. Exp. Med* 192: 789–799.
32. Nagayoshi T, Sanborn D, Hickok NJ, Olsen DR, Fazio MJ, et al. (1989) Human nidogen: complete amino acid sequence and structural domains deduced from cDNAs, and evidence for polymorphism of the gene. *DNA* 8: 581–594.
33. Kohfeldt E, Sasaki T, Göhring W, Timpl R (1998) Nidogen-2: a new basement membrane protein with diverse binding properties. *J. Mol. Biol* 282: 99–109.
34. Engel J, Schalch W (1980) Antibody binding constants from Farr test and other radioimmunoassays. A theoretical and experimental analysis. *Mol. Immunol* 17: 675–680.
35. Battaglia C, Mayer U, Aumailley M, Timpl R (1992) Basement-membrane heparan sulfate proteoglycan binds to laminin by its heparan sulfate chains and to nidogen by sites in the protein core. *Eur. J. Biochem* 208: 359–366.
36. Guinec N, Dalet-Fumeron V, Pagano M (1992) Quantitative study of the binding of cysteine proteinases to basement membranes. *FEBS Lett* 308: 305–308.
37. Dalet-Fumeron V, Boudjennah L, Pagano M (1998) Binding of the cysteine proteinases papain and cathepsin B-like to coated laminin: use of synthetic peptides from laminin and from the laminin binding region of the beta 1 integrin subunit to characterize the binding site. *Arch. Biochem. Biophys* 358: 283–290.
38. Gillet L, Roger S, Besson P, Lecaille F, Gore J, et al. (2009) Voltage-gated Sodium Channel Activity Promotes Cysteine Cathepsin-dependent Invasiveness and Colony Growth of Human Cancer Cells. *J. Biol. Chem* 284: 8680–8691.
39. Ohman H, Vahlquist A (1994) In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. *Acta Derm. Venereol* 74: 375–379.
40. Behrens DT, Villone D, Koch M, Brunner G, Sorokin L, et al. (2012) The Epidermal Basement Membrane Is a Composite of Separate Laminin- or Collagen IV-containing Networks Connected by Aggregated Perlecan, but Not by Nidogens. *J. Biol. Chem.* 287: 18700–18709.
41. 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.
42. Pungercic G, Dolenc I, Dolinar M, Bevec T, Jenko S, et al. (2002) Individual recombinant thyroglobulin type-1 domains are substrates for lysosomal cysteine proteinases. *Biol. Chem* 383: 1809–1812.
43. Meh P, Pavsic M, Turk V, Baici A, Lenarcic B (2005) Dual concentration-dependent activity of thyroglobulin type-1 domain of testican: specific inhibitor and substrate of cathepsin L. *Biol. Chem* 386: 75–83.
44. Yamashita M, Konagaya S (1996) A novel cysteine protease inhibitor of the egg of chum salmon, containing a cysteine-rich thyroglobulin-like motif. *J. Biol. Chem.* 271: 1282–1284.
45. Novinec M, Kordis D, Turk V, Lenarcic B (2006) Diversity and evolution of the thyroglobulin type-1 domain superfamily. *Mol. Biol. Evol.* 23: 744–755.
46. Ekblom P, Ekblom M, Fecker L, Klein G, Zhang HY, et al. (1994) Role of mesenchymal nidogen for epithelial morphogenesis in vitro. *Development* 120: 2003–2014.
47. Breitkreutz D, Mirancea N, Schmidt C, Beck R, Werner U, et al. (2004) Inhibition of basement membrane formation by a nidogen-binding laminin gamma1-chain fragment in human skin-organotypic cocultures. *J. Cell. Sci* 117: 2611–2622.
48. Mayer U, Mann K, Timpl R, Murphy G (1993) Sites of nidogen cleavage by proteases involved in tissue homeostasis and remodelling. *Eur. J. Biochem* 217: 877–884.
49. Kruse M-N, Becker C, Lottaz D, Köhler D, Yiallourou I, et al. (2004) Human meprin alpha and beta homo-oligomers: cleavage of basement membrane proteins and sensitivity to metalloprotease inhibitors. *Biochem. J* 378: 383–389.
50. Dziadek M, Paulsson M, Timpl R (1985) Identification and interaction repertoire of large forms of the basement membrane protein nidogen. *EMBO J* 4: 2513–2518.
51. Fleischmajer R, Schechter A, Bruns M, Perlsh JS, Macdonald ED, et al. (1995) Skin fibroblasts are the only source of nidogen during early basal lamina formation in vitro. *J. Invest. Dermatol* 105: 597–601.
52. Kwon Y-J, Pérez P, Aguilera S, Molina C, Leyton L, et al. (2006) Involvement of specific laminins and nidogens in the active remodeling of the basal lamina of labial salivary glands from patients with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 54: 3465–3475.
53. Sohar N, Sohar I, Hammer H (2005) Lysosomal enzyme activities: new potential markers for Sjögren's syndrome. *Clin. Biochem.* 38: 1120–1126.

Figure S1: Sage et al.

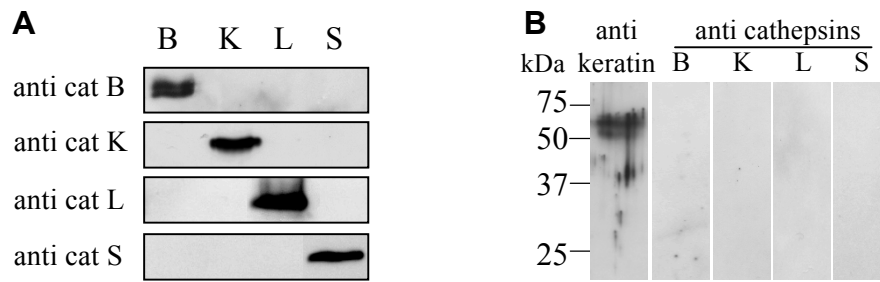
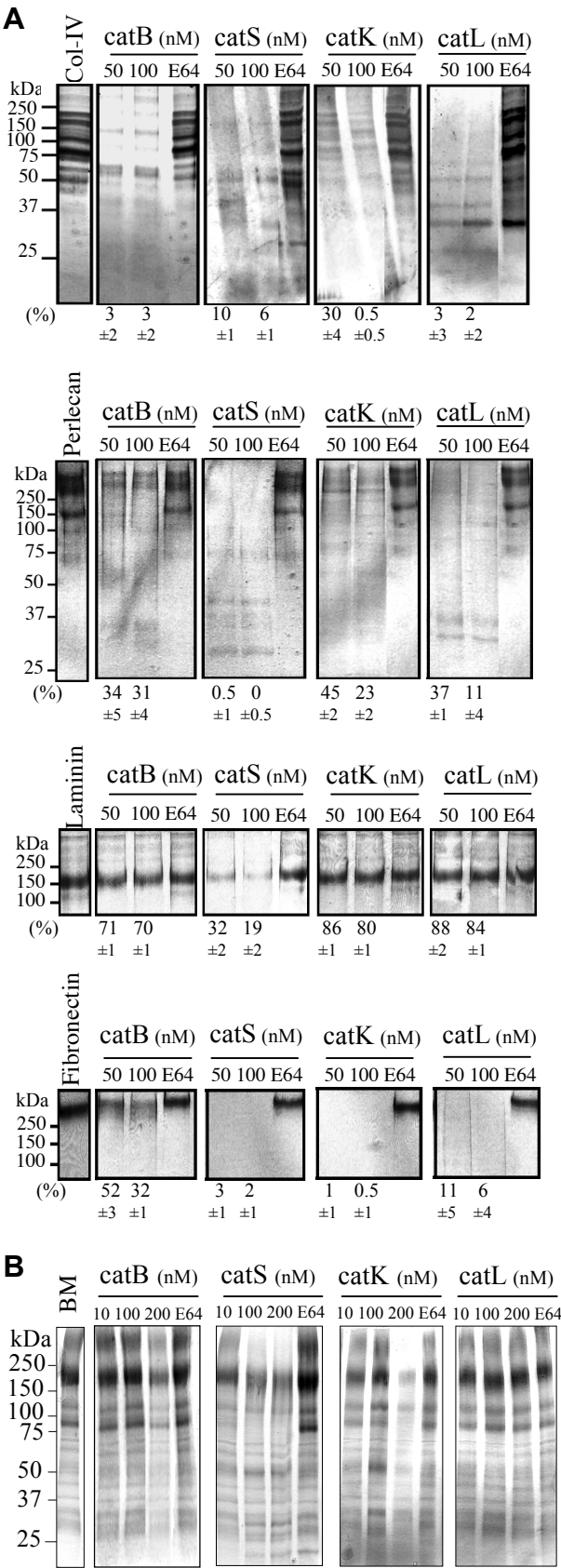


Figure S2: Sage et al.



Partie 2

Régulation de l'activité de la cathepsine S par les glycosaminoglycanes

2. Régulation de l'activité de la cathepsine S par les glycosaminoglycanes

Article 2 : Binding of chondroitin 4-sulfate to cathepsin S regulates its enzymatic activity
J. Sage, F. Mallèvre, F. Barbarin-Costes, S. Samsonov, J. Gehrcke,
M. T. Pisabarro, E. Perrier, S. Schnebert, A. Roget, T. Livache, C. Nizard,
G. Lalmanach & F. Lecaille
Manuscrit soumis

Les glycosaminoglycanes sont des polysaccharides linéaires chargés négativement présents dans les lysosomes, à la surface des cellules et au niveau de la matrice extracellulaire. Leurs domaines saccharidiques sulfatés leur permettent d'interagir avec de nombreuses molécules, facteurs de croissance et protéines. Les GAG sont ainsi capables de réguler l'activité de protéases, dont les cathepsines à cystéine (Tersariol *et al.*, 2002). En effet, les GAG permettent de faciliter l'automaturation des cathepsines et de stabiliser certaines de ces enzymes à pH neutre. Par exemple, l'héparine et l'héparane sulfate augmentent l'activité et la stabilité de la cathepsine B à pH 7,4 (Almeida *et al.*, 2001). De plus, la capacité de la cathepsine K à cliver les collagènes insolubles (collagènes I et II) est strictement dépendante de la formation, unique parmi les cathepsines, d'un complexe multimérique stable entre la cathepsine K et le chondroïtine 4-sulfate (Li *et al.*, 2002). Bien que de structure similaire à la cathepsine K, la cathepsine L ne peut en revanche pas se complexer au C4-S. Ces différences d'interaction entre les cathepsines et les GAG résultent en partie des différences de potentiel électrostatique de surface des cathepsines. En effet, la cathepsine K présente de larges régions chargées positivement, à l'opposé de son site actif, qui sont moins nombreuses dans la structure des autres cathepsines (**Figure 12**). Du fait de sa capacité à dégrader la matrice extracellulaire, la cathepsine S peut être délétère si elle n'est pas régulée. C'est pourquoi notre objectif a été de déterminer si la cathepsine S peut être régulée par la présence de GAG.

Dans cette étude, nous avons évalué la capacité de différents GAG sulfatés (héparine, héparane sulfate, chondroïtines 4- et 6-sulfate, dermatane sulfate) et non sulfatés (acide hyaluronique) à moduler l'activité de la cathepsine S. Il en résulte que l'activité protéolytique

de la cathepsine S vis-à-vis du collagène IV et d'un substrat fluorogénique, le Z-Phe-Arg-AMC, est significativement réduite *in vitro* par le C4-S de façon dose-dépendante. L'héparane sulfate et le chondroïtine 6-sulfate semblent également perturber l'activité de la cathepsine S, bien que dans une moindre mesure. L'activité de la cathepsine S est en partie rétablie en présence de NaCl, ce qui suggère que le C4-S perturbe l'activité de cette enzyme via des interactions électrostatiques. Cet effet modulateur affecte le site catalytique de la cathepsine S puisque les constantes cinétiques (k_{cat} , K_m et k_{cat}/K_m) de l'hydrolyse du Z-Phe-Arg-AMC sont significativement altérées en présence de C4-S. D'autre part, des doses croissantes en C4-S ont pour effet de ralentir la maturation de la procathepsine S à pH acide. Un complexe entre le C4-S et la cathepsine S a été mis en évidence en solution par chromatographie liquide (gel filtration). L'interaction a été mesurée par résonance plasmonique de surface ($K_d = 210 \pm 40$ nM) grâce à une collaboration avec le groupe de T. Livache (CEA de Grenoble). De plus, des analyses en spectroscopie de fluorescence intrinsèque de la cathepsine S révèlent que le C4-S induit un changement de conformation de l'enzyme. Par une approche de modélisation moléculaire réalisée par le groupe de M. T. Pisabarro (Université de Dresden, Allemagne), trois sites de fixation potentiels du C4-S ont été identifiés, différents de ceux précédemment décrits pour le complexe C4-S/cathepsine K. Parmi ces trois sites prédits, un site de fixation a été identifié à proximité du site actif de la cathepsine S, constitué des résidus Lys64 et Arg141.

L'implication de la cathepsine S a été démontrée dans de nombreux processus pathologiques tels que l'asthme, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, l'athérosclérose ou encore l'obésité. Des études cliniques ont par ailleurs démontré que dans ces pathologies, la cathepsine S était plus fortement exprimée et sécrétée que chez les sujets sains. Ainsi, la cathepsine S est une cible thérapeutique et plusieurs inhibiteurs de cette enzyme ont été développés dans le cadre de traitements de certaines de ces maladies (**Tableau 8**). Par cette étude nous montrons un nouveau mécanisme de régulation de la cathepsine S ; les GAG et notamment le C4-S pourraient alors servir de modèle au design de nouvelles molécules capables de cibler plus sélectivement et spécifiquement le site actif de la cathepsine S.

Binding of chondroitin 4-sulfate to cathepsin S regulates its enzymatic activity

Juliette Sage^{*,†}, Florian Mallèvre[‡], Fabien Barbarin-Costes[§], Sergey A. Samsonov^{||}, Jan-Philip Gehrcke^{||}, Maria Teresa Pisabarro^{||}, Eric Perrier[†], Sylvianne Schnebert[†], André Roget[‡], Thierry Livache[‡], Carine Nizard^{†,¶}, Gilles Lalmanach^{*,§}, Fabien Lecaillon^{*,§,#}

* INSERM, UMR 1100, Pathologies Respiratoires: protéolyse et aérosolthérapie, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, Université François Rabelais, F-37032 Tours cedex, France

† Louis Vuitton Moët Hennessy (LVMH-Recherche), F-45800 Saint Jean de Braye, France

‡ INAC CEA Grenoble, CREAB, UMR SPrAM 5819 (CEA, CNRS, UJF), F-38054 Grenoble Cedex 9, France

§ Département de Biochimie, Université François Rabelais, F-37200 Tours, France

|| Structural Bioinformatics, BIOTEC Technical University of Dresden, Tatzberg 47-51 01307 Dresden, Germany

¶ Laboratoire de Pharmacologie Cellulaire de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Centre de Recherche des Cordeliers, F-75006 Paris, France

#Corresponding author: F. Lecaillon, Inserm UMR 1100, Pathologies Respiratoires: protéolyse et aérosolthérapie, Equipe: Mécanismes protéolytiques dans l'inflammation, Université François Rabelais, 10 Boulevard Tonnellé, F-37032 Tours cedex, France. Tel : (+33) 247-366-047; Fax: (33) 247-366-046; E-mail: fabien.lecaillon@univ-tours.fr

Short title: Binding of C4-S to cathepsin S

Abbreviations used: AMC, 7 amino-4 methylcoumarin; Cat, cysteine cathepsin; C4-S, chondroitin 4-sulfate; C6-S, chondroitin 6-sulfate; DS, dermatan sulfate; DTT, dithiothreitol; E-64, L-3-carboxy-trans-2, 3-epoxypropionyl-leucylamido- (4-guanidino) butane; GAG, glycosaminoglycan; HA, hyaluronic acid; HP, heparin; HS, heparan sulfate; Z, benzyloxycarbonyl.

SYNOPSIS

Human cysteine cathepsin S (catS) participates in distinct physiological or pathophysiological cellular processes and is considered as a valuable therapeutic target in autoimmune diseases, cancer, atherosclerosis and asthma. We evaluated the capacity of negatively-charged glycosaminoglycans (heparin, heparan sulfate, chondroitin 4/6-sulfates, dermatan sulfate and hyaluronic acid) to modulate the activity of catS. Chondroitin 4-sulfate (C4-S) impaired both the collagenolytic activity (type IV collagen) and the peptidase activity (Z-Phe-Arg-AMC) of catS. Addition of NaCl restored catS activity, supporting that electrostatic interactions are primarily involved. Further, C4-S delayed in a dose-dependent manner the autocatalytic activation of procatS at pH 4.0. Formation of a stable C4-S/catS complex was demonstrated by gel-filtration chromatography and binding affinity was measured by surface plasmon resonance ($K_d = 210 \pm 40$ nM). Moreover, C4-S induced subtle conformational changes of mature catS as observed by intrinsic fluorescence spectroscopy analysis. Molecular docking predicted three specific binding sites on catS for C4-S. Particularly, residues K64 and R141, which are located in the vicinity of the catalytic cleft, may be critical for the modulation of the activity of catS. Thus, the targeting of C4-S binding sites may represent a novel mechanism of catS regulation.

Keywords: GAG, cysteine protease, interaction, modulation, molecular docking

INTRODUCTION

Cysteine cathepsin S (catS) is a member of the 11 known papain-like cysteine protease family (B, C, H, F, K, L, O, S, V, W and X). CatS is a lysosomal non-glycosylated single chain enzyme that exhibits some unique features including the ability to remain active and stable at neutral pH. It also has a restricted expression pattern, mainly confined to antigen presenting cells (for review: [1]). CatS is associated with a number of physiological processes including MHC class II antigen presentation and is involved in the pathogenesis of many diseases such as rheumatoid arthritis, osteoarthritis, asthma, psoriasis, as well atherosclerosis, cancer and obesity. Due to its relevant potency to hydrolyze various extracellular matrix (ECM) components (type IV and XVIII collagens, fibronectin, perlecan, nidogen), intensive investigations by academic and pharmaceutical companies have focused on catS for the development of drugs that specifically target its proteolytic activity [2].

Glycosaminoglycans (GAGs) are found on the cell surface and in ECM in most connective tissues but also in lysosomes. GAGs are linear macromolecules composed of a variable number of repeating disaccharide units and are classified into two main types; non sulfated GAGs including hyaluronic acid (HA), whereas sulfated GAGs group together chondroitin sulfate (CS) / dermatan sulfate (DS), keratan sulphate (KS) and heparin (HP) / heparan sulfate (HS). In addition to their structural role, GAGs play prominent roles in development and in many physiological processes that affect cell properties and functions [3–5]. The sulfated saccharide domains are important in providing docking sites for protein ligands, including growth factors, extracellular matrix proteins and enzymes [6]. Chondroitin sulfate (CS) is composed of repeating disaccharide units of glucuronic acid and galactosamine, which is commonly sulfated at C-4 or C-6 of galactosamine. CS is the most abundant GAG in human plasma (70-80% of all GAGs) with C4-S representing half of this fraction [7]. There is growing evidence that GAGs may interact with various proteases including serine proteases, matrix metalloproteases, acidic proteases and cysteine proteases [8–11]. Indeed GAGs have long been known to facilitate the autoprocessing of several lysosomal cysteine cathepsins, notably catB, L and S [12–17]. Furthermore, specific GAGs also regulate the activity of mature cathepsins B, K and X [18–21]. Contrary to catX, HP and HS were found to increase the activity and stability of catB at neutral pH, whilst chondroitin 4-sulfate (C4-S) forms a stable complex with catK and enhances its collagenolytic activity [22]. Conversely, high concentrations of HS and DS found in patients with mucopolysaccharidoses impair the degradation of type II collagen by catK [23]. Also, intralysosomal membrane binding GAGs,

in particular CS inhibit the activities of lysosomal hydrolases [24–26]. The differences in catalytic efficiency observed for several cysteine cathepsins in the presence of GAGs presumably reflect the differences in the electrostatic properties of cathepsins and in the backbone structure and sulfation pattern of GAGs.

According to the ubiquitous distribution of GAGs, we investigated the effect of GAGs of different structures and charges densities (HP, HS, C4-S, C6-S, DS and HA) and their capacity to modulate catS activity. C4-S significantly inhibited both the collagenolytic activity (type IV collagen) and the peptidase activity (Z-Phe-Arg-AMC) of catS *in vitro* and delayed the processing of procatS, in a concentration-dependent manner. We identified the formation of a stable complex between C4-S and catS by gel filtration and binding interactions were analyzed by intrinsic fluorescence spectroscopy, surface plasmon resonance and molecular modeling. Binding of C4-S to catS corresponds to a new mechanism of its enzymatic activity regulation and may be of biological relevance during ECM remodeling. Furthermore, the binding sites may represent a scaffold in the design of new regulators to target specifically this protease.

MATERIAL AND METHODS

Materials

Z-Phe-Arg-AMC (benzyloxycarbonyl-phenylalanyl-arginine-4-methylcoumarin) was purchased from Bachem (Bubendorf, Switzerland). Chondroitin 4-sulfate from bovine trachea (mw approx: 20-30 kDa), chondroitin 6-sulfate from shark cartilage (mw approx: 63 kDa), low molecular weight heparin from porcine intestinal mucosa (mw: 15-17 kDa), heparan sulfate from bovine kidney (mw approx: 14 kDa), dermatan sulfate from porcine intestinal mucosa (mw approx: 13-14 kDa), hyaluronic acid from *Streptococcus equi* (mw: 1400 kDa) were from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France; catalog numbers C8529, C4384, H4784, H7640, C3788, 53747, respectively). GAGs were diluted at 30 mg/mL (ie. stock solution: 3%, w/v) in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5 prior further studies.

CatS expression and purification

Human procathepsin S clone in pRSTEB vector was a kind gift from Dr. K. Schilling (Institute of Biochemistry I, Friedrich-Schiller-University Jena, Germany). Procathepsin S was expressed in the form of inclusion bodies in *Escherichia coli* strain BL21(DE3)pLysS. Expression, maturation and purification of recombinant catS was performed as described previously [27]. The active concentration was determined by titration with E-64 (L-*trans*-Epoxy succinylleucylamido-(4-guanidino)butane) (Sigma-Aldrich). Unless otherwise stated, assays were carried out at 37°C in the activity buffer of catS corresponding to 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5, containing 2 mM DTT and 0.01% Brij35.

Regulation of collagen IV proteolysis

CatS (10 nM) was preincubated for 1 h with each GAG (0.15%, w/v) in the activity buffer. Type IV collagen (0.8 mg/mL, Sigma-Aldrich) was then added to the mixture and incubated for 4 h. Reduced samples were deposited on SDS-PAGE 10% and fragments were revealed by Coomassie blue. Densitometry analysis of remaining $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of type IV collagen was performed using the free ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

The hydrolysis of fluorogenic DQ-collagen IV (15 μ g, Molecular Probes, Life Technologies, Saint Aubin, France) was measured in presence of catS (2 nM) previously incubated 1 h with each GAG (0.15%) in the activity buffer. The release of fluorescence (λ_{ex} : 495 nm, λ_{em} : 515 nm) was followed in 96-well microtiter plates (Nunc) by a spectromicrofluorimeter SpectraMax Gemini (Molecular Devices, Saint Grégoire, France), and slopes were calculated

with the software Softmaxpro (Molecular Devices). Assays were performed in triplicate and repeated two independent times. Values shown are the mean $\pm$ S.D.

Regulation of the peptidase activity

CatS (1 nM) was incubated in presence or in absence of GAG (0.15% or 0.3%) for 1 h in the activity buffer. After adding the fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-AMC (5 μ M), residual activities were measured by a Gemini spectrofluorimeter (λ_{ex} : 350 nm, λ_{em} : 460 nm). Experiments were also performed in the presence of NaCl (0-1.5 M). Assays were performed in duplicate and repeated three times in separate experiments and relative data are given as mean values $\pm$ S.D.

Steady-state kinetics were performed as previously described [28]. After 1 h preincubation of catS (1 nM) in presence or absence of GAG (0.15%) in the activity buffer, the enzymatic activity was followed by monitoring the fluorescence release of Z-Phe-Arg-AMC (Kontron SFM 25 spectrofluorimeter; λ_{ex} : 350 nm; λ_{em} : 460 nm). The values of k_{cat} and K_{m} were determined graphically from Hanes linear plot using various concentrations of substrate (1-100 μ M), and the accuracy of K_{m} and k_{cat} values confirmed by non-linear regression analysis (substrate concentration: 1-100 μ M). Second-order rate constant ($k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$) was measured under pseudo first-order conditions, i.e. using a substrate concentration far below the K_{m} . Experiments were performed in triplicate. Kinetic data were determined using the Enzfitter software (Biosoft, Cambridge, UK) and were reported as means $\pm$ S.D.

Maturation of procatS

Recombinant procathepsin S (10 μ g) was incubated in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.0, 2 mM DTT, 2 mM EDTA and 0.01% Brij35 at 37°C for up to 5 h in the absence or presence of C4-S (0.0025%, 0.15% and 0.3%). Aliquots were removed at timed intervals from 1 to 300 min. Following incubation, the samples were resuspended in SDS-PAGE loading buffer, boiled and separated by SDS-PAGE 15% under reducing conditions. Electrophoretic gels were colored by Coomassie blue staining. Experiments were performed three independent times. Densitometry analysis of unprocessed procathepsin S was performed using ImageJ software (normalized data were expressed as means $\pm$ S.D). In parallel, activation progress was monitored with the fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-AMC (10 μ M, final concentration).

Size exclusion chromatography

CatS (10 μ g) was preincubated in the presence or the absence of C4-S (0.3%) for 1 h in the activity buffer. Samples were then applied to a Superdex 200 column (AKTA purifier 900 HPLC system, Amersham, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden), previously equilibrated in the same buffer without DTT (corresponding to the elution buffer) at a flow rate of 0.5 mL/min. Protein elution was monitored at 280 nm. The calibration curve was obtained using the standard protein molecular weight markers (Amersham), ferritin (450 kDa), albumin (68 kDa), chymotrypsin (25 kDa) and cytochrome c (12.5 kDa). CatS enzymatic activity was recorded (fraction size: 0.5 mL) with Z-Phe-Arg-AMC (15 μ M). In parallel, C4-S was specifically revealed using 1,9 dimethylmethylen blue (DMB) assay (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Briefly, 170 μ L of DMB solution was added to each fraction (30 μ L) into a microtiter plate. The absorbance at 520 nm was then measured using a microtiter plate reader (VersaMax, Molecular Devices, St Grégoire, France). In addition, collected fractions were separated by 15% SDS-PAGE under reducing conditions and transferred onto a nitrocellulose membrane for Western-blotting. Immunoreactive catS was detected using a polyclonal goat anti-human cathepsin S antibody (1:1000, R&D Systems, Minneapolis, USA), as described elsewhere [29].

Intrinsic fluorescence spectroscopy

Fluorescence measurements were performed at 25°C using Varian Cary Eclipse spectrofluorimeter (Agilent Technologies, France). CatS (final concentration: 0.5 μ M) initially prepared in the activity buffer was incubated in buffer alone or with C4-S (0.03-0.3%) for an equilibration period of 5 min. Emission spectra were obtained by excitation at 280 nm and collected over the range of 300 - 450 nm with the slit widths set at 5 nm. The same experiments were performed with HP, DS, C6-S and HS (0.3%).

Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRi)

Pyrrolylated C4-S was prepared by a two step procedure involving the addition of adipic acid dihydrazide at the carbohydrate reducing end, then coupled to NHS-pyrrole (*N*-hydroxysuccinimidyl-6-(pyrrole-yl)-caproate) as described elsewhere [30,31]. Briefly, C4-S was dissolved at 0.15% (w/v) in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.0 with 50 mM of adipic acid dihydrazide, and then incubated at 56°C for 48 h. The reaction products were freeze-dried after purification in water on PD MidiTrap G-10 column (GE Healthcare). C4-S

hydrazide dissolved at 5 mM in phosphate buffer saline was then incubated for 2 h at room temperature with NHS-pyrrole at 10 mM in DMSO in a final PBS/DMSO (v/v) buffer. The reaction products were freeze-dried after purification in water by using a PD MidiTrap G-10 column, and then stored at -20°C. Pyrrolylated C4-S was solubilised in a polymerization solution (0.1 M sodium phosphate buffer, pH 6.8 containing 10% glycerol and pyrrole 20 mM), then immobilized on the gold surface of a pre-cleaned SPRi biochip by the polypyrrole electrospotting process. Biochip was used in SPRi-lab apparatus ($\lambda = 650$ nm, from Horiba Scientific - GenOptics). SPRi measurements were carried out in a 10 μ L hexagonal flow cell connected to PEEK tubing with a degassing system (Alltech) and a syringe pump (Tecan Cavro), in sodium acetate buffer (100 mM, pH 5.5) at 50 μ L/min and 25°C. The surface was blocked with BSA 1% (Sigma-Aldrich) before injection of catS (from 50 to 400 nM). The regeneration was carried out with NaCl 1 M. All data were analyzed during the experiment with dedicated SPRi-view software (Horiba Scientific - GenOptics) and later by Origin software (OriginLab). Fits were performed following a classical Langmuir model:

$\Delta R = (\Delta R_{\text{max}} * C) / (K_d + C)$ where R, C and K_d correspond to the reflectivity, the concentration of the enzyme and the equilibrium dissociation constant, respectively.

Molecular Docking

The X-ray structure of catS in complex with the inhibitor N-[(2S)-3-methyl-2-[1-[(E)-2-oxohept-5-en-3-yl]-1,2,3-triazol-4-yl]butan-2-yl]benzamide (PDB 2H7J [32]) and of catK (PDB 3C9E [33]) were used for calculations. The unbound structure of catS was obtained by removing the inhibitor from the complexed structure and by subsequent minimization of the binding site using the AMBER 99 force field as implemented in MOE (Molecular Operating Environment; Chemical Computing Group®, Montreal, Canada). The substrate Z-Phe-Arg-AMC was built in MOE and then docked to the substrate binding site of catS with Autodock using standard parameters for the Lamarckian genetic algorithm [34]. The complex obtained with catS and Z-Phe-Arg-AMC is very similar to the one of catS with the inhibitor (PDB 2H7J). The modeled complex structure was minimized in MOE, and the resulting refined model was used for docking calculations with GAGs. The structures of tetra- and hexasaccharides of C4-S and C6-S were modeled based on the structure of hexameric C4-S available in the PDB (PDB 1C4S, fiber diffraction [35]). Their geometries were optimized with the AMBER99 force field implemented in MOE. Blind docking of flexible tetra- and hexasaccharides of C4-S and C6-S to the surface of catK, unbound catS, and catS in complex with Z-Phe-Arg-AMC was carried out using Autodock. The atomic potential grid of the

proteins was calculated with a spacing of 0.375 Å. The Lamarckian genetic algorithm was used as search algorithm, with an initial population size of 300 and a termination condition of 10000 generations or 999500000 energy evaluations. A total of 1000 independent runs were performed. For clustering analysis, 50 and 100 top docking solutions were taken into account. Spatial clustering of the docking solutions was performed using the DBSCAN algorithm [36] with a neighborhood search radius of 4 Å. The distance between two structures was defined to be the root mean square of atomic distances, while pairing up nearest atoms of the same type. This distance metric is invariant under symmetry transformations applied to GAGs. For further analysis, we only considered the clusters corresponding to the 50 top scored solutions that had at least 4 members and in the 100 top scored solutions having at least 10 members.

Statistic analysis

All experiments were performed in duplicate or triplicate and repeated at least twice as independent experiments. Statistical significance was tested using Student's two-ways t-test. Data shown from Coomassie blue gel staining and western blot analysis are from representative experiments. A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant (*, *P*<0.05; **, *P*<0.01).

RESULTS

Type IV collagen proteolysis in the presence of GAG

Type IV collagen, a major component of the basal lamina of blood vessels is a substrate of catS [29,37]. Here, catS was incubated with type IV collagen in presence of GAGs (HP, HS, C4-S, C6-S, DS and HA) at a concentration of 0.15% corresponding to physiological concentrations found in human synovial and wound fluids [38,39]. As shown in **Figure 1A**, C4-S and to a less extent HS, strongly reduced the degradation of triple helical $\alpha 1(\text{IV})$ and $\alpha 2(\text{IV})$ chains, and the effect was reversed in presence of 0.5 M NaCl (data not shown). In contrast, the non sulfated HA enhanced type IV collagen degradation by catS. Moreover, a slight increase in the proteolysis of type IV collagen was observed in presence of DS. Of note, in absence of catS, type IV collagen was sensitive to spontaneous denaturation after 4 h of incubation in the presence of 0.15% HA, but not with other sulfated GAGs (HP and C6-S) (data not shown).

The modulation of the collagenolytic activity of catS by C4-S was confirmed using as substrate a quenched fluorescent derivative of type IV collagen (DQ-collagen IV) (**Figure 1B**). Indeed, C4-S proved as the most effective GAG tested since it reduced significantly ($p < 0.01$) the residual activity of catS ($36 \pm 4\%$). In the presence of HS, collagenolytic activity was found to substantially decrease as well ($73 \pm 5\%$), whilst none of the other GAGs impaired the activity of catS.

Effect of GAGs on the hydrolysis of peptidyl Z-Phe-Arg-AMC

The effect of GAGs on the peptidase activity of catS was studied by monitoring the hydrolysis of the fluorogenic dipeptidyl substrate, Z-Phe-Arg-AMC (**Figure 2A**). As observed for type IV collagen, C4-S, HS and also to a less extent C6-S significantly reduced the peptidase activity of catS (i.e. $47.5 \pm 1\%$, $48.9 \pm 1\%$ and $73.8 \pm 2\%$, respectively). Further, increasing the concentration of C4-S, HS and C6-S (0.3%) resulted in an additional ~1.5-fold reduction of the residual activity of catS. In contrast, HP, DS and HA had no apparent influence. The addition of NaCl restored catS activity in a dose dependent manner (**Figure 2B**). However, the activity of catS was not fully recovered ($70 \pm 3\%$) when the enzyme was incubated in presence of C4-S (0.3%) and NaCl (1.5 M). These results show that besides structural features of GAGs, it appeared likely that electrostatic interactions are of importance for interactions

between negatively-charged C4-S and catS. As a control, no autoproteolytic degradation of catS protein was observed in presence of C4-S after 4 h incubation (data not shown).

Kinetic parameters k_{cat} , K_m and k_{cat}/K_m were determined to further evaluate the influence of C4-S on the catalytic activity of catS (**Table 1**). The presence of C4-S resulted in a significant decrease in the k_{cat}/K_m value by a factor of 4. This effect is mostly related to the decrease in k_{cat} (~19-fold), whilst K_m value is modified by a factor of ~5. Presence of NaCl (1.5 M) abolished the effect promoted by C4-S ($k_{\text{cat}}/K_m = 128 \pm 22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) with a k_{cat} ($2.6 \pm 0.4 \text{ s}^{-1}$) similar to that measured for the catS-catalyzed hydrolysis of Z-Phe-Arg-AMC ($2.9 \pm 0.5 \text{ s}^{-1}$). In addition, HS and C6-S promoted a decrease of ~2-fold in second order rate constant, associated with a large decrease in k_{cat} and to a lesser extent in K_m . In contrast, HA promoted an increase of 1.5-fold of the peptidase activity, similar to that observed with type IV collagen. Our results indicate that the presence of sulfate groups as well as the degree of sulfation (0.8-0.9 sulfate group/disaccharide unit) are critical factors for the modulation of catS activity. Moreover, the spatial distribution of sulfate group in CS is of importance, as supported by the differences in the kinetic values between C6-S and C4-S (Table 1).

Effect of C4-S on procatS maturation

In initial experiments, an optimal acidic pH (0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.0, 2 mM DTT, 2 mM EDTA and 0.01% Brij35) was found for the processing of procatS at 37°C with half-times of ~40 min (i.e. time to achieve 50% final activity of catS) (**Figure 3**). Increasing amounts of C4-S (0.0025-0.3%) delayed the rate of proenzyme processing and in parallel raised the duration of the lag phase of full mature catS activity. A high concentration of C4-S (0.3%) resulted in ~4-fold increase of the half-time for complete procathepsin S processing. In separate experiments, HP, DS, C6-S and HS had no apparent effect on the rate of the processing of procathepsin, even at the highest GAG concentration used (0.3%) (data not shown). These results indicated that C4-S specifically restricts the maturation of catS in a dose dependent manner.

Binding studies of C4-S to catS

We used size exclusion chromatography to determine whether C4-S may bind tightly to catS in solution (**Figure 4A**). When catS was incubated with C4-S prior to loading on Superdex 200 column, an additional shoulder peak was detected at 280 nm and eluted (elution volume: 10-13 mL) well ahead of the single peak detected for the free catS (18-21 mL). In parallel,

enzymatic activity using Z-Phe-Arg-AMC as a substrate was detected in both peaks (data not shown). The shoulder peak, with an apparent mass centred at 165 kDa, varied between 68 and 450 kDa reflecting the mass heterogeneity of the commercial C4-S used, whilst the single peak of free catS corresponded to an apparent mass of 24 kDa. The presence of C4-S was specifically detected in fractions 10-13 mL by use of 1,9 dimethylmethylene blue ($A_{520\text{ nm}}$) (see material section for details). In addition, Western-blot analysis revealed that in the presence of C4-S, an additional immunoreactive catS band shifted to an elution volume of 12 mL, being consistent with the formation of a stable complex between C4-S and catS (**Figure 4B**). Under identical conditions, we did not observe the formation of a stable complex with DS.

To evaluate the binding affinity, interactions between C4-S and catS were analyzed by surface plasmon resonance (**Figure 4C**). After immobilization of C4-S onto a gold sensor chip, increasing concentrations of catS (50 to 400 nM) were passed over the surface. The results obtained (**Figure 4D**) showed that C4-S binds to catS with an equilibrium dissociation constant (K_d) of 210 ± 40 nM ($R^2 = 0.98$). Although kinetic rate constants could be determined by using a classical Langmuir equation model, the experimental values have to be regarded with care due to the mass heterogeneity that exists among commercial C4-S.

Effect of C4-S on catS intrinsic fluorescence spectra

The effect of C4-S upon catS conformation was examined by intrinsic fluorescence spectroscopy, despite there are many limitations and experimental difficulties to perform topographical analysis of multi-tryptophan containing proteins. The fluorescence spectrum of catS that displays four tryptophan residues (Trp7, Trp26, Trp180, Trp186) has a maximum at 334 nm (**Figure 5**). This is consistent with the fact that tryptophan residues are partly buried in a non polar environment [40]. The maximum of fluorescence of catS was shifted to longer wavelengths in presence of C4-S (i.e. +7 nm with 0.15% C4-S, +11 nm with 0.3% C4-S), indicating that interactions between C4-S and catS exposed tryptophan residues to a more polar environment. Moreover, C4-S (0.3%) induced a decrease in signal intensity of approximately 15% at 334 nm corresponding to a decrease of the quantum yield. This result confirmed that tryptophan residues are exposed to a more hydrophilic environment, reflecting subtle structural rearrangements of catS in the presence of C4-S. Like C4-S, both C6-S (0.3%) and HS (0.3%) caused a respective Stoke shift of the fluorescence of 12-nm and 15-nm, whilst

no shift was observed in presence of DS and HP. Data indicate that catS undergoes a conformational change in presence of sulfated oligosaccharides relative to their sulfate content (~0.9 sulfate groups/disaccharide) and support that in the presence of C4-S, tryptophan residues are partly solvent exposed on the surface of catS in contact with bound water [41].

Molecular docking of C4-S and C6-S to catS

Our experimental data show that C4-S binds to catS and specifically modulates the activity of catS *in vitro*. In order to delineate the nature of molecular mechanisms involved, and because there are currently no experimental structures available of catS in complex with C4-S, we have carried out computational studies for identification of putative C4-S binding sites on catS. Despite the high structural similarity between catS and catK ($\text{rmsd}_{C_\alpha} = 0.55 \text{ \AA}$) and the fact that they share a 58% and 82% in sequence identity and similarity, respectively, their electrostatic properties differ substantially (**Figure 6A**). Docking experiments performed on catK with C4-S identified as the most probable binding site the one observed experimentally by X-ray, whilst no overlap of the active site and the C4-S binding site has been reported. The region on catS corresponding to the GAG binding site observed in catK by X-ray (PDB 3C9E) is not positively charged. This makes this region in catS very unlikely to be involved in GAG binding. Indeed, docking experiments did not detect any putative C4-S binding site in this area for catS. Docking experiments performed on catS with C4-S identified three putative binding sites (**Figure 6B**). Site I consists of a patch formed by the positively charged residues Lys39, Lys41, Lys44, Lys104 and Arg106. Site II overlaps with the substrate binding site (**Figure 6C**) particularly with Lys64 and Arg141, which suggests that C4-S and substrate may sterically compete for this site. Site III is comprised of Arg120, Lys177, Arg200 and Lys202. Further, C4-S binding to site II is favored by prior addition of the substrate Z-Phe-Arg-AMC, which is reflected by the size of the clusters resulting from the docking (**Table 2**; i.e. 21 cluster members vs. 15 for site II, and 4 members vs. 11 for site I for docking with and without substrate, respectively). The binding of C4-S to site II (**Figure 6C**) would hinder the dissociation of Z-Phe-Arg-AMC and, therefore, may slow down the reaction carried out by the protease, as we measured experimentally (**Figure 2**, **Table 1**).

With respect to the GAG length, the obtained docking scores suggested that a tetrasaccharide could be the smallest GAG unit required for specific binding to catS, as recently observed for another GAG:protein system [42]. Upon GAG elongation, no proportional increase of

docking scores was observed (**supplementary Tables 1-3**). Furthermore, comparison of docking results for C4-S and C6-S suggested a small preference of C4-S to site II and of C6-S to site I (Table 2), which corroborates the difference in K_m values measured with catS in presence of C4-S or C6-S (Table 1).

DISCUSSION

The results of the present study extend previous investigations of the regulatory effect of GAGs on cysteine cathepsins. Here we show that C4-S interacts specifically with catS and regulates both proteolytic and peptidic activities. Among tested GAGs (HP, HS, C4-S, C6-S, DS and HA), only C4-S possesses an adapted molecular pattern that reduces significantly the hydrolysis by catS of type IV collagen and the dipeptidyl substrate Z-Phe-Arg-AMC. This effect relies on the catalytic machinery of catS since the Michaelis-Menten parameters for the hydrolysis of Z-Phe-Arg-AMC are altered. Binding of negatively-charged C4-S to catS is mainly governed by ionic interactions since increasing salt concentration restored its activity towards Z-Phe-Arg-AMC. The finding that HS and C6-S influenced as well the endopeptidase activity of catS indicates that the degree of sulfation may be an important parameter for promoting a decrease in catS activity, considering that HP is the most sulfated GAG with an average of ~2.5 sulfate groups/disaccharide, DS has ~1.1 sulfate groups/disaccharide whilst C4-S, C6-S and HS contain ~0.9 sulfate groups/disaccharide. Furthermore, DS contains iduronic acid (instead of glucuronic acid for CS) that has a weaker hydrogen-bonding potential, thus favoring a higher flexibility of the oligosaccharide structure [43]. Our current observations are consistent with previous results on the potent inhibition of collagenolytic activity of catS towards type I and II collagens by C4-S [22]. Further, we found that C4-S delayed processing of the proenzyme. This result is apparently conflicting with previous reports supporting that GAGs facilitate the autocatalytic processing of proenzyme-related papain family at basic pH or acidic pH [16,17]. Nevertheless *in vitro* studies were performed with low concentrations (5-20 $\mu\text{g/mL}$) of GAGs while higher concentrations (> 150 $\mu\text{g/mL}$) were found in human synovial and wound fluids [38,39], which makes it difficult to compare with previous reports. Our findings indicate unambiguously that the ability of C4-S to impair maturation of procatS is specific since other sulfated GAGs were not able to hinder significantly the activation process (data not shown). CatS contains four tryptophane residues, two of which are located within the active site. Trp26 is closed to Cys25 (catalytic residue) and Trp186 forms in part with His164 the bottom

of the well-shaped S1' pocket [44]. In contrast, Trp7 and Trp180 that are distant from the active site belong to the C-terminal domain composed mainly of β -strands (right domain). Despite precise topographical studies of catS are limited by the presence of four tryptophan residues, analysis of fluorescence spectra indicated that interactions between C4-S and catS led to some subtle structural rearrangement of catS. Indeed both the shift of wavelength maximum fluorescence emission and the decrease of fluorescence intensity support that tryptophan residues are exposed to a more hydrophilic and polar environment in the presence of C4-S.

At variance with previous studies using gel mobility shift assays, we detected the formation of a stable high molecular mass complex between catS and C4-S by gel-filtration chromatography. C4-S binds to catS in the submicromolar range ($K_d = 210 \pm 40$ nM) with a weaker affinity dissociation constant in comparison to the C4-S/catK complex ($K_d = 10 \pm 8$ nM) [33]. Molecular docking identified three putative binding sites for C4-S on catS. The identified residues in catS involved in C4-S binding sites are different from those observed in the C4-S/catK crystal structure. Site I reveals a cluster of three positively charged lysine residues (Lys39, Lys41 and Lys45), opposite to the substrate binding cleft of the enzyme. This motif is also found in catK but was not identified as a potential C4-S binding site. In site II, the sidechains of two basic residues, Lys64 and Arg141, may interact with C4-S. The positively charged Lys64, present in the S3 subsite of catS may provide electrostatic interactions that are unique within the cysteine cathepsin family. In contrast, catK contains an acidic residue (Asp) at this position. Another distinctive structural feature of catS is the positively charged residue Arg141, stemming from the proximal region of the S1' subsite and pointing toward the top of the S1 subsite. It has been proposed that the guanidinium group of Arg141 may be responsible for the specificity of the cleavage of the MHC class II-associated invariant chain Ii by catS [45]. Although no heparin-binding site in catS has been demonstrated, the cationic binding sequence in site III (Lys177, Arg200 and Lys202), which is solvent exposed, is closed to a site that has been proposed as a putative heparin-binding site in papain (papain sequence: Arg188, Ile189, Lys190, Arg191) [11].

In this report, we identify specific C4-S binding sites in catS that differ from those in C4-S/catK complex and we propose that binding of C4-S to catS may represent a novel regulatory mechanism of catS enzymatic activity. Further, as extracellular catS can exert a large panel of physiological actions, depending on its microenvironment, the binding between catS and the abundant C4-S throughout the matrix may have biological significance. The modulation of

GAG expression during tissue repair or ECM remodeling may contribute to the regulation of matrix degradation by cathepsins and other proteases, such as serine proteases and MMP-2 and MMP-9 and their natural inhibitors [9,46,47]. The regulation of catS activity by C4-S may provide valuable insights for the understanding of the beneficial effect of C4-S in diseases such as osteoarthritis, psoriasis or obesity, in which - due to its deleterious effects - catS is a validated target [1,48].

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. Bernd Wiederanders and Dr. Klaus Schilling (Institute of Biochemistry I, Friedrich Schiller University, Jena, Germany) for providing the cDNA clone of human procathepsin S and their helpful technical informations. We would like to thank the ZIH at TU Dresden for providing high-performance computational resources and Ralf Gey for technical assistance. We acknowledge Dr. Reuben Ramphal (Department of Medicine, University of Florida, Gainesville, Florida, USA) for english proofreading. R. Ramphal is currently one-year visiting scientist at INSERM UMR 1100 (Studium Chair, Région Centre, France).

FUNDING

This work was financially supported in part by LVMH Recherche (Saint Jean de Braye, France) and by institutional funding from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). JS holds a doctoral fellowship from the Association Nationale de la Recherche Technique (ANRT, France; CIFRE PhD funding). FM, AR, and TL are funded by the Agence Nationale de la Recherche (WallArrayII project: ANR-10-GENM-0010). MTP and SAS are funded by the German Research Council (DFG SFB-TRR67 TPA7). JPG is funded by the Studienstiftung des deutschen Volkes.

REFERENCES

- 1 Small, D., Burden, R. and Scott, C. (2011) The Emerging Relevance of the Cysteine Protease Cathepsin S in Disease. *Clin. Rev. Bone Miner Metab.* **9**, 122–132.
- 2 Turk, B. (2006) Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 785–799.
- 3 Häcker, U., Nybakken, K. and Perrimon, N. (2005) Heparan sulphate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 530–541.
- 4 Bishop, J. R., Schuksz, M. and Esko, J. D. (2007) Heparan sulphate proteoglycans fine-tune mammalian physiology. *Nature* **446**, 1030–1037.
- 5 Alexopoulou, A. N., Multhaupt, H. A. B. and Couchman, J. R. (2007) Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 505–528.
- 6 Gandhi, N. S. and Mancera, R. L. (2008) The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem. Biol. Drug Des.* **72**, 455–482.
- 7 Lamari, F. N., Theocharis, A. D., Asimakopoulou, A. P., Malavaki, C. J. and Karamanos, N. K. (2006) Metabolism and biochemical/physiological roles of chondroitin sulfates: analysis of endogenous and supplemental chondroitin sulfates in blood circulation. *Biomed. Chromatogr.* **20**, 539–550.
- 8 Forteza, R., Lauredo, I., Abraham, W. M. and Conner, G. E. (1999) Bronchial tissue kallikrein activity is regulated by hyaluronic acid binding. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **21**, 666–674.
- 9 Isnard, N., Robert, L. and Renard, G. (2003) Effect of sulfated GAGs on the expression and activation of MMP-2 and MMP-9 in corneal and dermal explant cultures. *Cell Biol. Int.* **27**, 779–784.
- 10 Beckman, M., Freeman, C., Parish, C. R. and Small, D. H. (2009) Activation of cathepsin D by glycosaminoglycans. *FEBS J.* **276**, 7343–7352.
- 11 Almeida, P. C., Nantes, I. L., Rizzi, C. C., Júdice, W. A., Chagas, J. R., Juliano, L., Nader, H. B. and Tersariol, I. L. (1999) Cysteine proteinase activity regulation. A possible role of heparin and heparin-like glycosaminoglycans. *J. Biol. Chem.* **274**, 30433–30438.
- 12 Mason, R. W. and Massey, S. D. (1992) Surface activation of pro-cathepsin L. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 1659–1666.
- 13 Ishidoh, K. and Kominami, E. (1994) Multi-step processing of procathepsin L in vitro. *FEBS Lett.* **352**, 281–284.
- 14 Kopitar, G., Dolinar, M., Strukelj, B., Pungercar, J. and Turk, V. (1996) Folding and activation of human procathepsin S from inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. *Eur.*

J. Biochem. **236**, 558–562.

15 Rozman, J., Stojan, J., Kuhelj, R., Turk, V. and Turk, B. (1999) Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin B is a bimolecular process. *FEBS Lett.* **459**, 358–362.

16 Vasiljeva, O., Dolinar, M., Pungercar, J. R., Turk, V. and 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.

17 Caglic, D., Pungercar, J. R., Pejler, G., Turk, V. and Turk, B. (2007) Glycosaminoglycans facilitate procathepsin B activation through disruption of propeptide-mature enzyme interactions. *J. Biol. Chem.* **282**, 33076–33085.

18 Almeida, P. C., Nantes, I. L., Chagas, J. R., Rizzi, C. C., Faljoni-Alario, A., Carmona, E., Juliano, L., Nader, H. B. and 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.

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

20 Novinec, M., Kovacic, L., Lenarcic, B. and Baici, A. (2010) Conformational flexibility and allosteric regulation of cathepsin K. *Biochem. J.* **429**, 379–389.

21 Nascimento, F. D., Rizzi, C. C. A., Nantes, I. L., Stefe, I., Turk, B., Carmona, A. K., Nader, H. B., Juliano, L. and Tersariol, I. L. S. (2005) Cathepsin X binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Arch. Biochem. Biophys.* **436**, 323–332.

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

23 Wilson, S., Hashamiyan, S., Clarke, L., Saftig, P., Mort, J., Dejica, V. M. and Brömme, D. (2009) Glycosaminoglycan-mediated loss of cathepsin K collagenolytic activity in MPS I contributes to osteoclast and growth plate abnormalities. *Am. J. Pathol.* **175**, 2053–2062.

24 Avila, J. L. and Convit, J. (1975) Inhibition of leucocytic lysosomal enzymes by glycosaminoglycans in vitro. *Biochem. J.* **152**, 57–64.

25 Avila, J. L. (1978) The influence of the type of sulphate bond and degree of sulphation of glycosaminoglycans on their interaction with lysosomal enzymes. *Biochem. J.* **171**, 489–491.

- 26 Yasuda, Y., Li, Z., Greenbaum, D., Bogyo, M., Weber, E. and Brömme, D. (2004) Cathepsin V, a novel and potent elastolytic activity expressed in activated macrophages. *J. Biol. Chem.* **279**, 36761–36770.
- 27 Kramer, G., Paul, A., Kreusch, A., Schüler, S., Wiederanders, B. and Schilling, K. (2007) Optimized folding and activation of recombinant procathepsin L and S produced in *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.* **54**, 147–156.
- 28 Lecaille, F., Chowdhury, S., Purisima, E., Brömme, D. and Lalmanach, G. (2007) The S2 subsites of cathepsins K and L and their contribution to collagen degradation. *Protein Sci.* **16**, 662–670.
- 29 Sage, J., Leblanc-Noblesse, E., Nizard, C., Sasaki, T., Schnebert, S., Perrier, E., Kurfurst, R., Brömme, D., Lalmanach, G. and Lecaille, F. (2012) Cleavage of nidogen-1 by cathepsin s impairs its binding to basement membrane partners. *PLoS ONE* **7**, e43494.
- 30 Mercey, E., Grosjean, L., Roget, A. and Livache, T. (2007) Surface plasmon resonance imaging on polypyrrole protein chips: application to streptavidin immobilization and immunodetection. *Methods Mol. Biol.* **385**, 159–175.
- 31 Bartoli, J., Roget, A. and Livache, T. (2012) Polypyrrole-oligosaccharide microarray for the measurement of biomolecular interactions by surface plasmon resonance imaging. *Methods Mol. Biol.* **808**, 69–86.
- 32 Patterson, A. W., Wood, W. J. L., Hornsby, M., Lesley, S., Spraggon, G. and Ellman, J. A. (2006) Identification of selective, nonpeptidic nitrile inhibitors of cathepsin s using the substrate activity screening method. *J. Med. Chem.* **49**, 6298–6307.
- 33 Li, Z., Kienetz, M., Cherney, M. M., James, M. N. G. and Brömme, D. (2008) The crystal and molecular structures of a cathepsin K:chondroitin sulfate complex. *J. Mol. Biol.* **383**, 78–91.
- 34 Morris, G. M., Goodsell, D. S., Halliday, R. S., Huey, R., Hart, W. E., Belew, R. K. and Olson, A. J. (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J. Comput. Chem.* **19**, 1639–1662.
- 35 Winter, W. T., Arnott, S., Isaac, D. H. and Atkins, E. D. (1978) Chondroitin 4-sulfate: the structure of a sulfated glycosaminoglycan. *J. Mol. Biol.* **125**, 1–19.
- 36 Ester, M., Kriegel, H., S, J. and Xu, X. (1996) A density-based algorithm for discovering clusters in large spatial databases with noise, pp 226–231, AAAI Press.
- 37 Wang, B., Sun, J., Kitamoto, S., Yang, M., Grubb, A., Chapman, H. A., Kalluri, R. and Shi, G.-P. (2006) Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. *J. Biol. Chem.* **281**, 6020–6029.

- 38 Møller, H. J., Larsen, F. S., Ingemann-Hansen, T. and Poulsen, J. H. (1994) ELISA for the core protein of the cartilage large aggregating proteoglycan, aggrecan: comparison with the concentrations of immunogenic keratan sulphate in synovial fluid, serum and urine. *Clin. Chim. Acta* **225**, 43–55.
- 39 Penc, S. F., Pomahac, B., Winkler, T., Dorschner, R. A., Eriksson, E., Herndon, M. and Gallo, R. L. (1998) Dermatan sulfate released after injury is a potent promoter of fibroblast growth factor-2 function. *J. Biol. Chem.* **273**, 28116–28121.
- 40 Eftink, M. R. and Ghiron, C. A. (1976) Exposure of tryptophanyl residues in proteins. Quantitative determination by fluorescence quenching studies. *Biochemistry* **15**, 672–680.
- 41 Vivian, J. T. and Callis, P. R. (2001) Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophys. J.* **80**, 2093–2109.
- 42 Pichert, A., Samsonov, S. A., Theisgen, S., Thomas, L., Baumann, L., Schiller, J., Beck-Sickinger, A. G., Huster, D. and Pisabarro, M. T. (2012) Characterization of the interaction of interleukin-8 with hyaluronan, chondroitin sulfate, dermatan sulfate and their sulfated derivatives by spectroscopy and molecular modeling. *Glycobiology* **22**, 134–145.
- 43 Casu, B., Petitou, M., Provasoli, M. and Sinaÿ, P. (1988) Conformational flexibility: a new concept for explaining binding and biological properties of iduronic acid-containing glycosaminoglycans. *Trends Biochem. Sci.* **13**, 221–225.
- 44 Pauly, T. A., Sulea, T., Ammirati, M., Sivaraman, J., Danley, D. E., Griffor, M. C., Kamath, A. V., Wang, I.-K., Laird, E. R., Seddon, A. P., et al. (2003) Specificity determinants of human cathepsin S revealed by crystal structures of complexes. *Biochemistry* **42**, 3203–3213.
- 45 Guncar, G., Pungercic, G., Klemencic, I., Turk, V. and Turk, D. (1999) Crystal structure of MHC class II-associated p41 Ii fragment bound to cathepsin L reveals the structural basis for differentiation between cathepsins L and S. *EMBO J.* **18**, 793–803.
- 46 Fath, M. A., Wu, X., Hileman, R. E., Linhardt, R. J., Kashem, M. A., Nelson, R. M., Wright, C. D. and Abraham, W. M. (1998) Interaction of secretory leukocyte protease inhibitor with heparin inhibits proteases involved in asthma. *J. Biol. Chem.* **273**, 13563–13569.
- 47 Ermolieff, J., Boudier, C., Laine, A., Meyer, B. and Bieth, J. G. (1994) Heparin protects cathepsin G against inhibition by protein proteinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **269**, 29502–29508.
- 48 Palermo, C. and Joyce, J. A. (2008) Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends Pharmacol. Sci.* **29**, 22–28.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Effect of GAGs on the hydrolysis of type IV collagen by catS.

(A) Type IV collagen (0.8 mg/mL) was incubated with catS (10 nM) in the absence or presence of 0.15% (w/v) GAGs (HP, heparin; DS, dermatan sulfate, C4-S, chondroitin 4-sulfate; C6-S, chondroitin 6-sulfate; HS, heparan sulfate; HA, hyaluronic acid). The digest experiments were performed at 37°C for 4 h of incubation in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5, 2 mM DTT and 0.01% Brij35. Samples were deposited on SDS-PAGE 10% and fragments were revealed by Coomassie blue. Percentages (densitometry analysis) of residual type IV collagen are shown $\pm$ S.D. (B) Similar assays were performed with the fluorogenic DQ-collagen IV substrate (15 μ g) incubated for 1 h at 37°C with catS (2 nM) in the absence or presence of 0.15% (w/v) GAGs. Experiments were performed three independent times (*, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ when compared to control).

Figure 2: C4-S impairs the hydrolysis of Z-Phe-Arg-AMC.

(A) CatS (1 nM) was preincubated with different GAGs (0.15%, grey bar; 0.3%, white bar) in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5, 2 mM DTT and 0.01% Brij35 for 1 h at 37°C. (B) CatS (1 nM) was preincubated for 1 h at 37°C with 0.15% C4-S (grey bar) or 0.3% C4-S (white bar) at pH 5.5 in presence of different concentrations of NaCl (0-1.5 M). Hydrolysis of Z-Phe-Arg-AMC (5 μ M) was monitored by spectrofluorometer. Experiments were performed at least three independent times (*, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$ when compared to control).

Figure 3: C4-S shifts the maturation of procatS in a dose dependent manner.

(A) SDS-PAGE analysis of procathepsin S processing in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.0, containing 2 mM DTT, 2 mM EDTA and 0.01% Brij35 at 37°C in presence of different concentrations of C4-S (0-0.3%, w/v). Samples were taken at several times up to 5 h incubation. Densitometry analyses of remaining procatS are shown. (B) Endopeptidase activity was assayed against Z-Phe-Arg-AMC and is expressed in percentage.

Figure 4: Interaction between C4-S and catS.

Gel filtration assay with catS (10 μ g) in presence (dashed line) or in absence (continuous line) of C4-S (300 μ g) using Superdex 200 column. (A) Absorbance (280 nm) of eluted fractions (0.5 mL). (B) Collected fractions (0-30 mL) were transferred to nitrocellulose membrane for catS immunodetection. The frame indicates the presence of a higher apparent molecular mass

for catS. **(C)** Sensorgrams by SPRi of catS injected at different molar concentrations on C4-S spots. As a control, assays were performed to the gold surface of a pre-cleaned SPRi biochip without the pyrrolylated oligosaccharide and to polypyrrol spots. **(D)** Equilibrium dissociation constant (K_d) between C4-S and catS.

Figure 5: Intrinsic fluorescence spectra of catS in the presence of C4-S.

The excitation wavelength was 280 nm, the emission spectra were monitored from 300 to 450 nm at 25°C. Emission fluorescence spectra of catS (500 nM) alone (black line) or in presence of different concentrations of C4-S (grey line) in pH 5.5. Arrows indicate the maximum λ_{em} shift towards longer wavelengths (1) and the decrease of fluorescence intensity (2).

Figure 6: Structural models of C4-S binding to catS.

(A) Electrostatic potential surfaces of catS and catK. Blue color corresponds to positive and red color to negative. "Front view" of both enzymes and "back view" following 180° rotation around the vertical axis are presented (left and right panels, respectively). The negatively charged C4-S hexasaccharide (cyan) bound to catK ("back view") is shown in sticks (PDB 3C9E). **(B)** "Back view" of three putative binding sites (I, II and III) of C4-S on catS identified by docking. Docked C4-S are shown in sticks. The surface of catS is shown in grey with Lys/Arg residues involved in recognition in blue and labeled. C4-S binding site II is depicted below following 90° rotation around the horizontal axis of the "back view". Sites III and I on the left and right are rotated around the vertical axis by 90° relative to site II. **(C)** Docked Z-Phe-Arg-AMC bound to catS (represented in balls and sticks, and as surface, respectively). Lys/Arg residues comprising the binding site are labeled and depicted in blue. Below, docked C4-S tetrasaccharide in binding site II when Z-Phe-Arg-AMC is already bound.

Table 1: Kinetic parameters for the hydrolysis of Z-Phe-Arg-AMC by catS in the presence and in the absence of GAGs.

GAG (0.15%)	Sulfation	Disaccharide units	$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (mM ⁻¹ . s ⁻¹)	K_{M} (μM)	k_{cat} (s ⁻¹)
	degree (SO ₄ ²⁻ /di- saccharide)				
no GAG	-		93.0 ± 13	31.0 ± 2.6	2.90 ± 0.5
HP	2.5	L-IdoA2S-α(1→4)-D-GlcNS6S-α(1→4)	72.6 ± 13	7.2 ± 0.8	0.53 ± 0.08
DS	1.1	L-IdoA-α(1→3)-D-GalNAc4S-β(1→4)	64.5 ± 12	7.5 ± 0.9	0.49 ± 0.11
C4-S	0.9	D-GlcA-β(1→3)-D-GalNAc4S-β(1→4)	22.5 ± 0.5	6.7 ± 1	0.15 ± 0.02
C6-S	0.9	D-GlcA-β(1→3)-D-GalNAc6S-β(1→4)	43.0 ± 8	15.0 ± 1.2	0.65 ± 0.14
HS	0.8	D-GlcA-β(1→4)-D-GlcNAc-α(1→4)	38.0 ± 2	4.7 ± 1.1	0.18 ± 0.04
HA	0	D-GlcA-β(1→4)-D-GlcNAc-α(1→4)	142.0 ± 12	10.5 ± 0.7	1.50 ± 0.18

L-IdoA2S: iduronic acid 2 sulfate N glucosamine-2,6 disulfate, GlcN: N-glucosamine, GalNAc: N-acetylgalactosamine, GlcA: glucuronic acid.

Table 2: Clustering of top 50 results of 1000 docking runs for catS and tetrasaccharides C4-S and C6-S.

GAG	Site	- Z-Phe-Arg-AMC					+ Z-Phe-Arg-AMC				
		Cluster size	¹ E _{min}	² <E>±sd	³ R _{min}	⁴ <R>	Cluster size	¹ E _{min}	² <E>±sd	³ R _{min}	⁴ <R>
C4-S	I	11	-17.4	-16.1±0.7	1	15.7	4	-16.4	-15.7±0.7	1	11.8
	II	15	-17.2	-15.8±0.6	2	19.8	21	-15.8	-15.2±0.3	6	14.3
	III	4	-15.8	-15.7±0.1	27	29.3	10	-16.3	-15.3±0.5	2	21.0
C6-S	I	27	-17.7	-16.5±0.4	5	15.7	6	-17.3	-16.1±0.8	1	13.2
	II	5	-17.2	-16.5±0.5	12	28.8	9	-16.5	-15.7±0.5	5	17.7
	-	4	-20.0	-18.2±1.3	1	3.8			-		
	III	4	-17.9	-17.0±0.9	3	17	8	-16.2	-15.6±0.4	6	21.1

¹Minimal energy within a cluster; ²Mean energy within a cluster ± standard deviation;
³Lowest rank for all members within a cluster; ⁴Difference between mean rank within a cluster and the lowest possible ranking value for this cluster size.

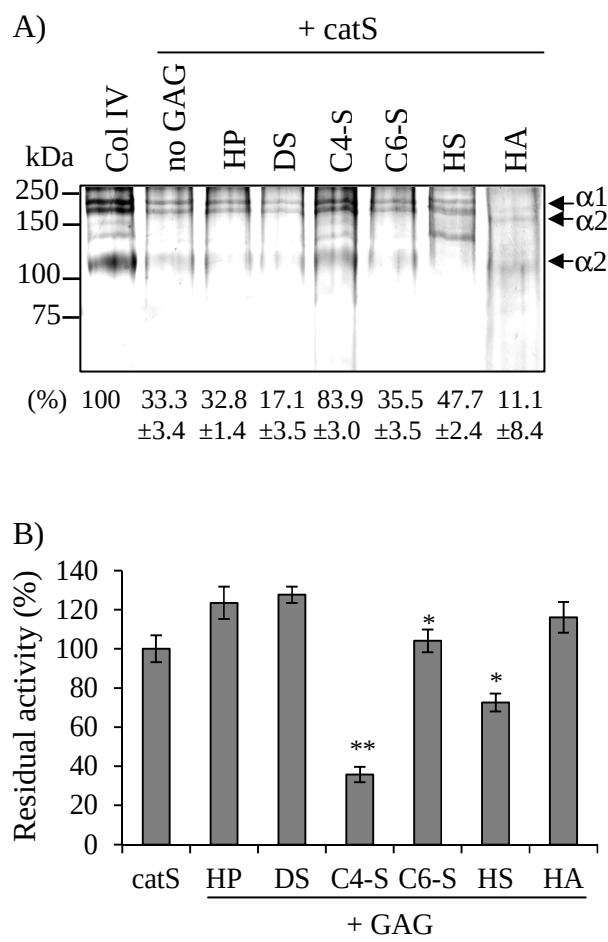


Figure 1: Sage et al.,

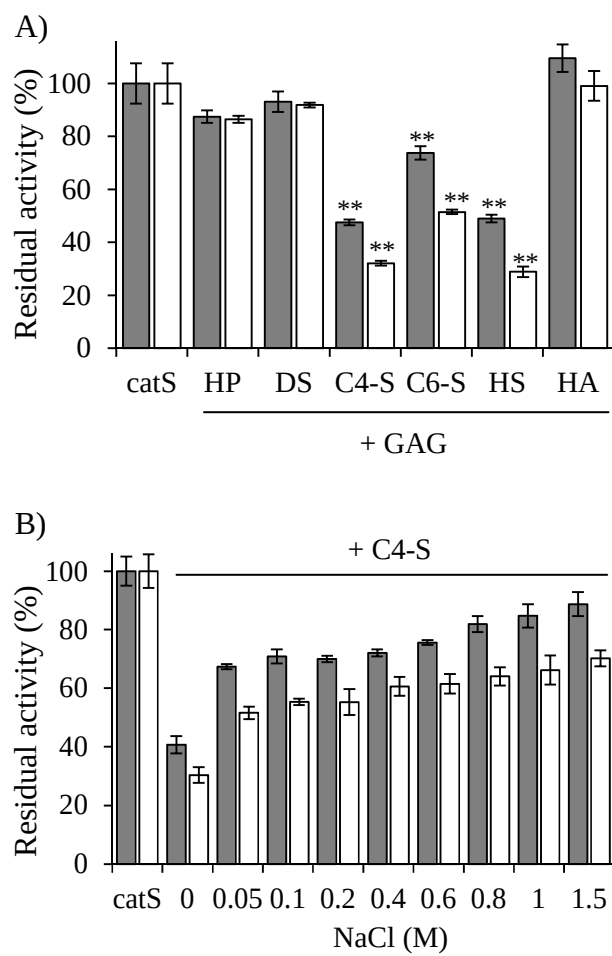


Figure 2: Sage et al.,

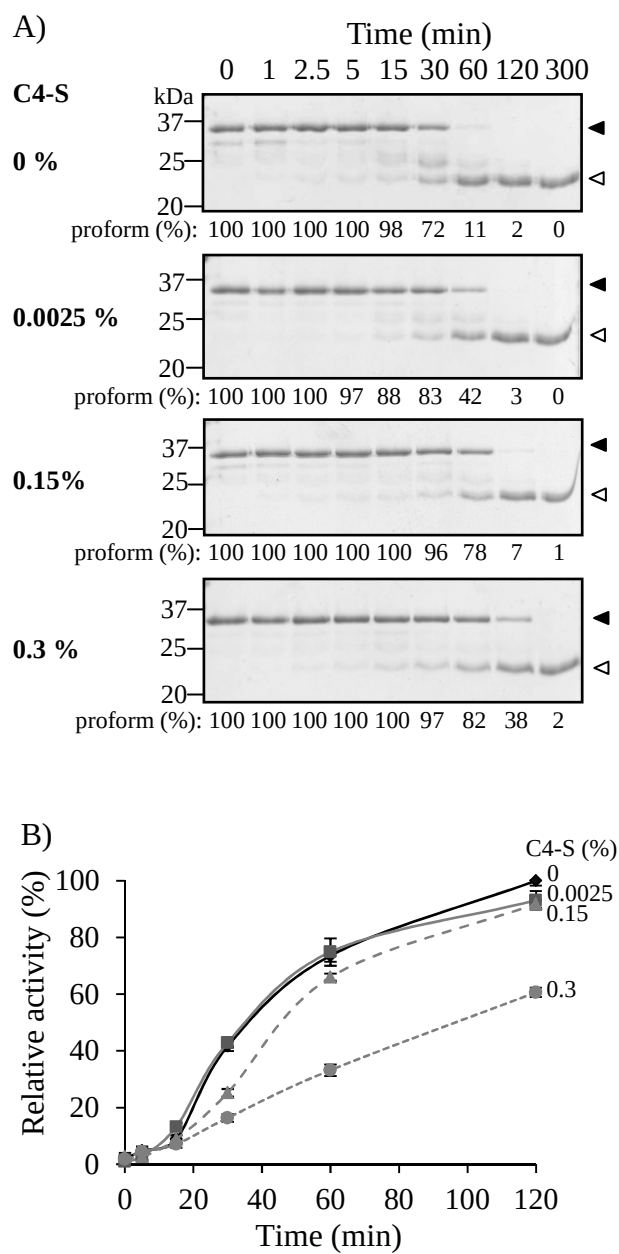


Figure 3: Sage et al.,

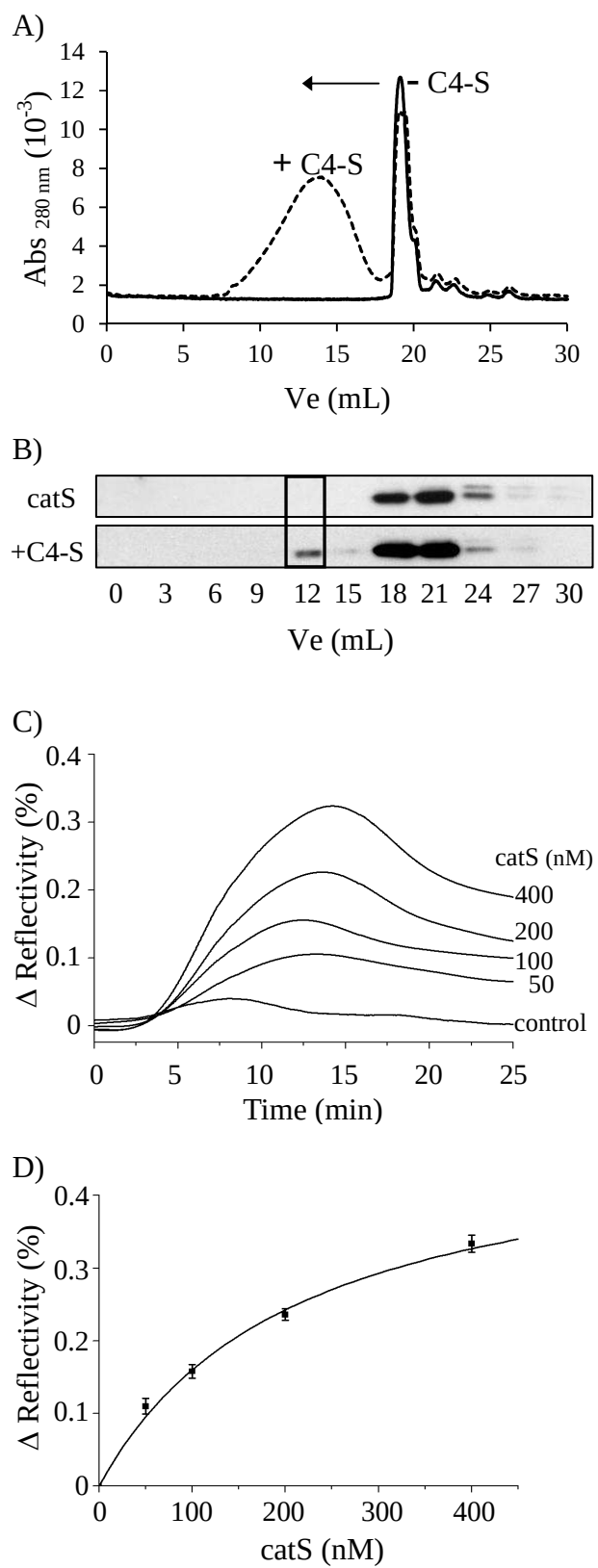


Figure 4: Sage et al.,

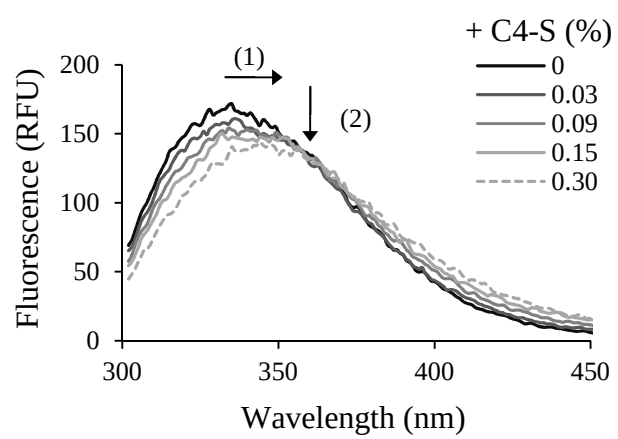


Figure 5: Sage et al.,

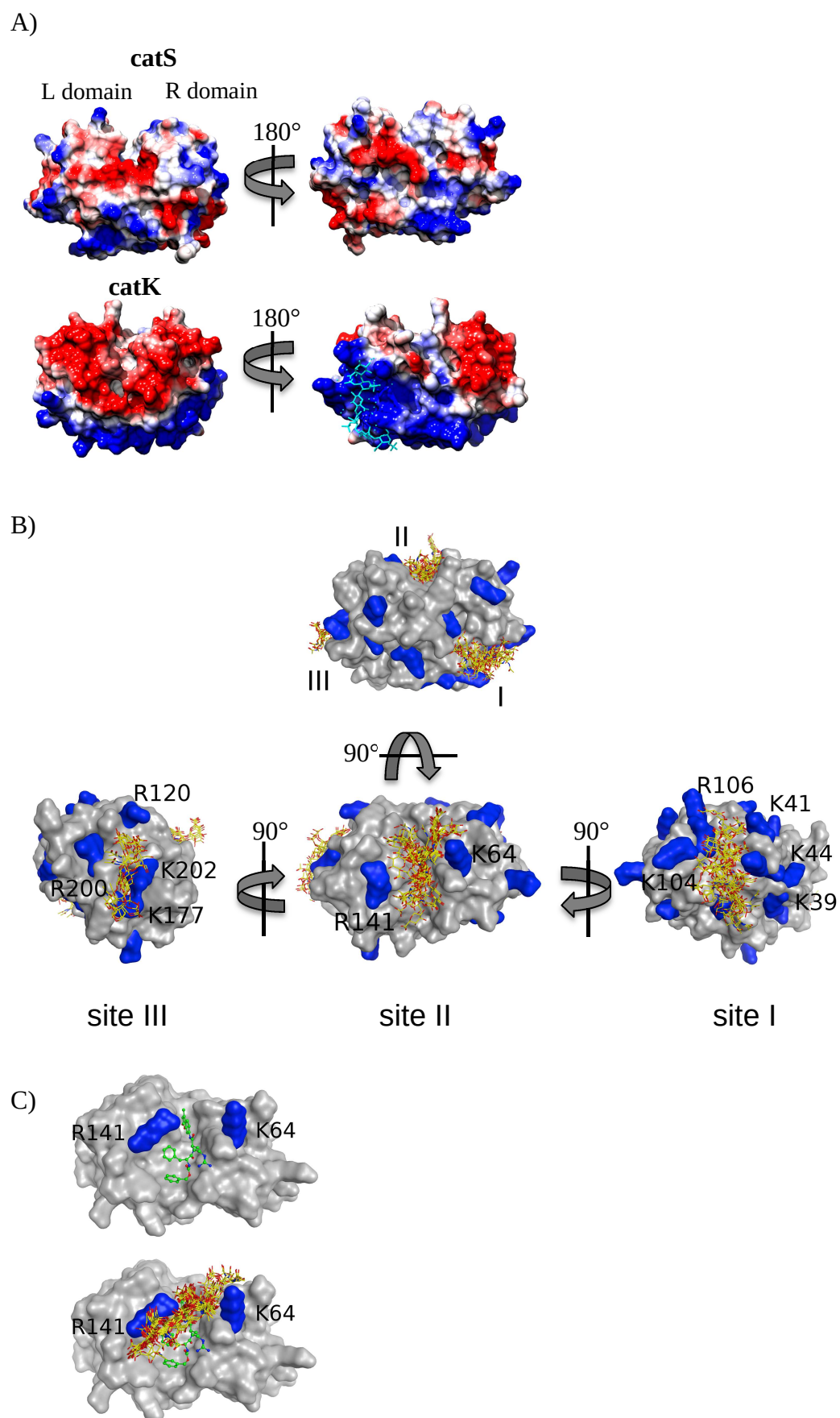


Figure 6: Sage et al.,

Supplementary Table 1. Clustering of top 100 results of 1000 docking runs for tetrasaccharides.

GAG	Site	- Z-Phe-Arg-AMC					+ Z-Phe-Arg-AMC				
		Cluster size	¹ E _{min}	² <E>±sd	³ R _{min}	⁴ <R>	Size	¹ E _{min}	² <E>±sd	³ R _{min}	⁴ <R>
C4-S	Site I	25	-17.4	-15.6±0.7	1	32.8	-	-	-	-	-
	Site II	26	-17.2	-15.5±0.6	2	34.2	37	-15.8	-14.8±0.5	6	26.9
	Site III	20	-16.9	-15.5±0.6	3	39.9	12	-16.3	-15.1±0.6	2	26.3
C6-S	Site I	47	-17.7	-16.2±0.5	5	23.8	23	-16.1	-15.2±0.5	7	36.3
							15	-16.2	-15.2±0.5	6	41.3
	Site II	-	-	-	-	-	17	-16.5	-15.3±0.6	5	36.6
	Site III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹Minimal energy within a cluster; ²Mean energy within a cluster ± standard deviation; ³Lowest rank for all members within a cluster; ⁴Difference between mean rank within a cluster and the lowest possible ranking value for this cluster size.

Supplementary Table 2. Clustering of top 50 results of 1000 docking runs for hexasaccharides.

GAG	Site	- Z-Phe-Arg-AMC					+ Z-Phe-Arg-AMC				
		Cluster size	¹ E _{min}	² <E>±sd	³ R _{min} n	⁴ <R>	Size	¹ E _{min}	² <E>±sd	³ R _{min}	⁴ <R>
CS4	Site I	8	-19.9	-18.1±1.0	3	21.5	-	-	-	-	-
		7	-19.0	-18.5±0.4	7	8.9					
	Site II	-	-	-	-	-	7	-17.3	-16.6±0.4	12	25.9
	Site III	-	-	-	-	-	4	-17.9	-17.2±0.8	6	17.0
							4	-16.9	-16.6±0.3	19	28.0
CS6	Site I	36	-23.3	-19.6±1.1	1	7.3	4	-21.2	-18.3±2.0	2	30.3
	Site II	-	-	-	-	-	8	-18.9	-18.0±0.5	9	16.4
							5	-21.3	-19.9±1.5	1	6.6
	Site III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹Minimal energy within a cluster; ²Mean energy within a cluster ± standard deviation; ³Lowest rank for all members within a cluster; ⁴Difference between mean rank within a cluster and the lowest possible ranking value for this cluster size

Supplementary Table 3. Clustering of top 100 results of 1000 docking runs for hexasaccharides.

GAG	Site	- Z-Phe-Arg-AMC					+ Z-Phe-Arg-AMC				
		Cluster size	¹ E _{min}	² <E>±sd	³ R _{min}	⁴ <R>	Size	¹ E _{min}	² <E>±sd	³ R _{min}	⁴ <R>
CS4	Site I	36	-19.9	- 17.5±1.1	3	25.1	-	-	-	-	-
	Site II	-	-	-	-	-	11	-17.3	-16.3±0.6	12	42.4
	Site III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS6	Site I	67	-23.3	- 18.9±1.1	1	13.1	-	-	-	-	-
	Site II	-	-	-	-	-	11	-18.9	-17.7±0.7	9	30.6
	Site III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹Minimal energy within a cluster; ²Mean energy within a cluster ± standard deviation; ³Lowest rank for all members within a cluster; ⁴Difference between mean rank within a cluster and the lowest possible ranking value for this cluster size.

Partie 3

Influence du vieillissement sur l'expression et l'activité des cathepsines à cystéine humaines dans l'épiderme

3. Influence du vieillissement sur l'expression et l'activité des cathepsines à cystéine humaines dans l'épiderme

Article 3 : Aged human skin displays reduced expression and activity of epidermal cathepsin S

J. Sage, D. De Quéral, E. Leblanc-Noblesse, R. Kurfurst, S. Schnebert, E. Perrier, C. Nizard, G. Lalmanach & F. Lecaille

Manuscrit soumis

Le vieillissement de la peau, que ce soit le vieillissement chronologique ou le photovieillissement, s'accompagne d'importantes altérations morphologiques et structurales de ses constituants, notamment au niveau du derme. En effet, les rides et la perte d'élasticité qui apparaissent avec l'âge résultent en grande partie de la dégradation et de la désorganisation des réseaux de collagène et d'élastine dans le derme et de la JDE. La dégradation excessive de ces structures est due à l'augmentation de l'expression de certaines protéases telles que les MMP (MMP-1, -2, -3 et -9) et les protéases à sérine (élastase), phénomène qui est exacerbé dans le photovieillissement (pour revue : Naylor *et al.*, 2011). En effet, l'irradiation UV induit une inflammation cutanée à l'origine de l'activation de ces protéases et de l'inactivation de leurs inhibiteurs endogènes, conduisant à un déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases en faveur de la protéolyse (pour revue : Pillai *et al.*, 2005). Bien que les cathepsines à cystéine possèdent un fort potentiel élastinolytique et collagénolytique, leur statut au cours du vieillissement cutané reste à ce jour peu documenté. Récemment, une équipe chinoise a montré par immunohistochimie à partir de peaux âgées d'origine asiatique une diminution de l'expression protéique au niveau du derme et de l'épiderme des cathepsines B et K, après exposition aux UV (Lai *et al.*, 2010 ; Zheng *et al.*, 2011). En parallèle, ces auteurs montrent que l'irradiation de fibroblastes humains par des UV induit également la diminution de l'expression génique et protéique des cathepsines B et K. La première étude (Lai *et al.*, 2010), menée sur un échantillonnage de 6 donneurs âgés

(moyenne d'âge : 55 ± 5 ans), compare uniquement l'effet de la photo-exposition et non l'effet de l'âge. La deuxième étude (Zheng *et al.*, 2011), analyse également l'effet de la photo-exposition, mais cette fois par l'irradiation *in vitro* de peaux photoprotégées de donneurs jeunes (moyenne d'âge : 24 ± 2 ans). Dans ce contexte, notre objectif a été de déterminer si l'expression protéique et l'activité enzymatique des principales cathepsines à cystéine humaines sont modifiées avec l'âge et la photo-exposition, à partir de peaux de donneurs d'origine Caucasienne.

Pour cette étude, nous avons réalisé un marquage immunofluorescent des cathepsines B, K, L, S et V à l'aide d'anticorps dont la spécificité et la sélectivité ont été validées précédemment (Sage *et al.*, 2012 ; **Article 1**), sur des coupes de peaux issues d'un panel de 20 femmes d'origine Caucasienne jeunes (moyenne d'âge : $21,6 \pm 2,5$ ans) et âgées (moyenne d'âge : $65,7 \pm 3,2$ ans). Après acquisition des images par microscopie confocale, l'expression des cathepsines dans l'épiderme a été quantifiée par analyse d'image (logiciel Leica QWin) puis normalisée par rapport à la surface de l'épiderme. Il en résulte que l'expression protéique totale (proformes et formes matures) des cathepsines B et L, qui sont des enzymes ubiquitaires, reste constante avec l'âge. À l'inverse, l'expression des cathepsines K, S et V, qui sont plus tissu-spécifiques, diminue de façon significative ($p < 0,01$) avec l'âge. Lors de cette étude, nous disposions pour chaque donneur d'une coupe de peau issue d'une zone photoprotégée et d'une zone photo-exposée. Cela nous a ainsi permis de montrer que la diminution de l'expression des cathepsines K et S est due au vieillissement intrinsèque mais est accentuée ($p < 0,05$) durant le photovieillissement. L'expression de la cathepsine V, quant à elle, semble n'être due qu'à l'effet du vieillissement intrinsèque, puisqu'aucune différence significative n'a pu être observée entre les zones photoprotégées et photo-exposées des donneurs âgés. Bien que l'expression de la cathepsine L ne varie pas avec l'âge, nous avons toutefois observé une diminution de son expression avec la photo-exposition chez les donneurs âgés ($p < 0,05$), contrairement à l'expression de la cathepsine B qui reste constante avec la photo-exposition. En parallèle, nous avons étudié l'expression protéique et l'activité des cathepsines dans des lysats d'épidermes isolés de peaux de donneurs jeunes ($n=3$, moyenne d'âge : $23 \pm 5,7$ ans) et de donneurs âgés ($n=3$, moyenne d'âge : $66,3 \pm 3,7$ ans). Les lysats ont été préalablement conservés en présence d'un cocktail d'inhibiteurs des autres classes de protéases (Sage *et al.*, 2012). Le titre en cathepsines totales est significativement réduit avec l'âge ($p < 0,05$), passant d'environ $1,15 \pm 0,2$ $\mu\text{mol/g}$ de protéines chez les donneurs jeunes à $0,58 \pm 0,08$ $\mu\text{mol/g}$ de protéines chez les donneurs âgés. Concernant plus

particulièrement la cathepsine S, son activité diminue significativement avec l'âge ($p < 0,01$), ce qui est corrélé en western-blot avec une diminution de sa forme mature dans les lysats épidermiques issus de donneurs âgés. Une étude de l'influence de l'âge sur les niveaux de transcripts des cathepsines a également été menée à partir de kératinocytes humains normaux issus de donneurs jeunes ($n=3$) et âgés ($n=3$). La disparité observée entre les trois individus au sein d'un même groupe d'âge ne nous permet pas de mesurer un effet significatif du vieillissement sur l'expression génique de ces enzymes.

Le statut des cibles moléculaires des cathepsines à cystéine (constituants majoritaires de la membrane basale et fibres élastiques du derme) au cours du vieillissement chrono- et photo-induit a également été étudié. L'expression de l'élastine des fibres oxytalanées et élastiques est fortement diminuée avec l'âge et avec la photo-exposition, phénomène déjà bien établi dans le processus de vieillissement cutané. L'expression de la laminine au niveau de la JDE est elle aussi fortement diminuée avec l'âge, mais n'est pas exacerbée dans le photovieillissement. De façon surprenante, l'expression du nidogène-1, pour lequel l'effet de l'âge au niveau cutané n'a jamais été reporté, semble au contraire être stable.

En parallèle de cette étude, nous avons également analysé par immunofluorescence le statut des inhibiteurs endogènes des cathepsines présents dans l'épiderme, la stéfine A (inhibiteur intracellulaire) et la cystatine M/E (inhibiteur extracellulaire), au cours du vieillissement. L'expression de la stéfine A diminue significativement avec l'âge ($p=0,02$), phénomène qui est accentué par la photo-exposition chez les donneurs âgés, tandis que celle de la cystatine M/E reste constante. Ainsi, l'activité intracellulaire des cathepsines, même si plus faible avec l'âge, serait moins bien régulée par la stéfine A, tandis qu'au niveau extracellulaire leur activité resterait régulée par la cystatine M/E de façon constante.

En conclusion, cette étude montre que les cathepsines à cystéine sont également une classe de protéases dont l'expression et l'activité sont modifiées durant le vieillissement cutané. De façon surprenante, contrairement à certaines MMP et protéases à sérine, l'expression des cathepsines K, S et V dans l'épiderme est diminuée. Il serait intéressant d'étudier également le statut de ces enzymes au niveau du derme. En effet, une étude montre qu'après irradiation par les UVA et UVB, des fibroblastes humains normaux sur-expriment la cathepsine K, ce qui suggère un rôle de cette enzyme élastinolytique dans le phénomène d'élastose solaire associé au photovieillissement (Codriansky *et al.*, 2009). Alors que l'expression de la cystatine M/E reste constante avec l'âge, celle de la stéfine A, dont l'un des rôles est de protéger l'organisme

contre les protéases à cystéine de pathogènes, est diminuée. Cela pourrait en partie expliquer l'augmentation de la susceptibilité aux infections qui est observée chez les personnes âgées.

Aged human skin displays reduced expression and activity of epidermal cathepsin S

Juliette Sage^{1,2}, Delphine De Quéral², Emmanuelle Leblanc-Noblesse², Robin Kurfurst², Sylvianne Schnebert², Eric Perrier², Carine Nizard², Gilles Lalmanach¹, Fabien Lecaille^{1,*}

¹INSERM, UMR 1100, Pathologies Respiratoires: protéolyse et aérosolthérapie, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, Université François Rabelais, F-37032 Tours cedex, France. ²LVMH-Recherche, BP58, F-45800 Saint Jean de Braye, France.

*Corresponding author: F. Lecaille, (PhD) Inserm UMR 1100, Pathologies Respiratoires: protéolyse et aérosolthérapie, Equipe: Mécanismes protéolytiques dans l'inflammation, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, Université François Rabelais, Faculté de Médecine, 10 Boulevard Tonnellé, F-37032 Tours cedex, France. Tel : (+33) 247-366-047; Fax: (+33) 247-366-046; e-mail: fabien.lecaille@univ-tours.fr

Short title: cathepsin S and aged skin

Keywords: aging, basement membrane, cysteine cathepsins, inhibitors, keratinocytes, nidogen, UV

Abbreviations used: AMC, 7 amino-4 methylcoumarin; Cat, cysteine cathepsin; DTT, dithiothreitol; E-64, L-3-carboxy-trans-2, 3-epoxypropionyl-leucylamido- (4-guanidino) butane; Z, Benzyloxycarbonyl.

Skin aging translates drastic structural and functional alterations particularly in the extracellular matrix (ECM) and dermal-epidermal junction (DEJ). The hallmark of clinical aged skin manifestations are characterized by wrinkle formation in the epidermis, sagging, thinning, dryness, a reduced immune response and a slow wound healing (Robert et al. 2009). It is believed that multiple mechanisms are involved, including changes in proteases expression. Indeed, at the molecular level, aged skin is accompanied by the accumulation of reactive oxygen species (ROS) that up-regulate various matrix metalloproteinases (MMPs) production, leading to an increased degradation of ECM and accumulation of non-functional matrix components. Besides to MMPs and serine proteases, which have been extensively investigated in aged skin (Pillai et al. 2005), few reports have related to other classes of proteases, including cysteine cathepsins. These proteolytic enzymes (11 members) have long been regarded as lysosomal house-keeping enzymes which ensure the degradation and the recycling of endocytosed proteins. Cysteine cathepsins also participate in specific cellular proteolytic processes in human skin, such as hair follicle morphogenesis, basement membrane (BM) /ECM turnover, skin color, apoptosis and senescence (Tobin et al. 2002; Bivik et al. 2006; Chen et al. 2006; Rünger et al. 2007; Kraus et al. 2011) as well various pathophysiological events (e.g. tumorogenesis, metastasis, inflammation, psoriasis, Papillon-Lefevre syndrome) (Lecaille et al. 2002). On the other hand, possible contribution of human cathepsins in the homeostasis of epidermis in elderly people is still lacking.

For the first time, we investigated the intrinsic age-related expression and enzymatic activity of cathepsins B, K, L, S and V in young and aged Caucasian women skin epidermis by immunofluorescence, Western-blot and kinetics studies. Staining of cathepsins S, K and V, which are known to be tissue specific, was strongly reduced ($p < 0.01$) in intrinsic aged skin biopsies (average 65.7 ± 3.2 years, $n=10$) compared with younger counterparts (average 21.6 ± 2.5 years, $n=10$) (**Figure 1A**). Conversely, cathepsins B and L that are ubiquitously found in tissues, were constitutively expressed during normal aging. Nevertheless, changes in expression of cathepsin B were reported for aging-related diseases like rheumatoid arthritis, atherosclerosis, osteoarthritis and Alzheimer (Yan and Sloane 2003). In parallel, a reduced content of elastin fibers was measured in dermis upon aging ($p < 0.01$), validating the standard morphometric structural changes observed in aged skin (**Figure 1B**). We previously reported that cathepsin S may participate in the BM remodeling, particularly by degrading efficiently nidogen-1, a key protein in the BM architecture (Sage et al. 2012). To our knowledge no studies have analyzed the expression *in situ* of human nidogen-1 during normal skin aging. Immunofluorescence staining of nidogen-1 (**Figure 1B**) revealed a similar pattern of protein

expression, contrary to other basement membrane constituents such as laminins ($p<0.01$) or type IV collagen as reported elsewhere (Vázquez et al. 1996), which are both reduced upon aging. Recently, it has been shown that nidogen-1 protein was over-expressed in mouse retina upon aging (Kunze et al. 2010). Although some BM components decline with aging, the basement membrane thickness increases significantly in an age-dependent manner (Xi et al. 1982; Vázquez et al. 1996), which may correspond to a reduction in tissue turnover. Our data suggest that cathepsin S, which is down expressed, contrary to MMPs in the epidermis of elderly people, may modify the homeostatic remodeling of BM proteins, particularly nidogen-1. In addition, cell lysates of aged epidermis showed a significant ~ 2 -fold lower cathepsins activity ($0.58 \pm 0.08 \mu\text{mol/g}$ of proteins) than young epidermis ($1.15 \pm 0.19 \mu\text{mol/g}$ of proteins), no matter which skin extract tested (**Figure 2A**). Cathepsin B is the major cysteine cathepsin in both epidermis lysates since about $\sim 85\%$ of the total cathepsin activities is inhibited after addition of the specific cathepsin B inhibitor (CA-074). While no significant changes were observed in the mRNA expression of cathepsin S in young and aged keratinocytes, the predominant cell type in epidermis (**Figure S1**), both its intracellular protein level and specific enzymatic activity ($p<0.01$) were reduced in epidermis lysates of elderly donors (**Figure 2B, C**). Contrary to epidermis cell lysates, the overall cysteine cathepsin activity in conditioned media of keratinocytes isolated from young and aged skin epidermis, were not statistically different. These data were correlated by Western-blot analysis (**Figure S1**). However, a slight decrease in cathepsin S activity was detected in the supernatant of keratinocytes from aged donors ($n=3$). Further, we focused on cystatins A and M/E that are both cysteine protease inhibitors expressed in the epidermis, and which play a role in epidermal development and maintenance (Zeeuwen et al. 2009) (**Figure 1C**). The amount of cystatin A, an intracellular cysteine protease inhibitor was decreased in aged skin ($p=0.02$). In contrast, the protein expression of cystatin M/E, which is expressed also extracellularly in the stratum granulosum, remained identical. These observations may suggest that there is an apparent balanced regulation of cathepsins activity with their endogenous inhibitors in the epidermis during normal aging.

Here, we present first evidence that cathepsin S protein and its activity are reduced in the epidermis of aged women. Cathepsin S in addition to closely related cathepsins K and V could play an important role in the DEJ homeostasis during normal aging. Skin aging is a combination of both intrinsic chronological and photo-induced processes. We found that photoexposure in elderly subjects led to a significant decrease of cathepsins L ($p=0.03$), K ($p=0.03$) and S ($p=0.05$) protein levels, but not cathepsins B and V (**Figure S2**). Conversely,

no significant difference was found in young donors. The photoaging process is accompanied by enhanced oxidative conditions that may alter both cysteine cathepsins expression and activity by the inactivation of their active site (Nagaoka et al. 2005). Likewise, we propose that elastinolytic cathepsin S may play an additional and important regulatory function in BM remodeling and in the recycling of abnormal elastic fibers at the DEJ during photoaging, raising the question of its relevance as a negative biomarker of skin aging.

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was financially supported by LVMH Recherche (Saint Jean de Braye, France) and by institutional funding from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). J.S. holds a doctoral fellowship from the Association Nationale de la Recherche Technique (ANRT, France; CIFRE PhD funding). We thank Clarisse Marteau (Plateforme de Modélisation Cellulaire et Tissulaire, Département Sciences du Vivant, LVMH Recherche) for her technical help on skin explants.

REFERENCES

- Bivik, CA, Larsson, PK, Kågedal, KM, *et al.* (2006). UVA/B-induced apoptosis in human melanocytes involves translocation of cathepsins and Bcl-2 family members. *J Invest Dermatol* 126: 1119–27.
- Chen, N, Seiberg, M, Lin, CB (2006). Cathepsin L2 levels inversely correlate with skin color. *J Invest Dermatol* 126: 2345–7.
- Kraus, S, Bunsen, T, Schuster, S, *et al.* (2011). Cellular senescence induced by cathepsin X downregulation. *Eur J Cell Biol* 90: 678–86.
- Kunze, A, Abari, E, Semkova, I, *et al.* (2010). Deposition of nidogens and other basement membrane proteins in the young and aging mouse retina. *Ophthalmic Res* 43: 108–12.
- Lecaille, F, Kaleta, J, Brömme, D (2002). Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chem Rev* 102: 4459–88.
- Nagaoka, Y, Otsu, K, Okada, F, *et al.* (2005). Specific inactivation of cysteine protease-type cathepsin by singlet oxygen generated from naphthalene endoperoxides. *Biochem Biophys Res Commun* 331: 215–23.
- Pillai, S, Oresajo, C, Hayward, J (2005). Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *Int J Cosmet Sci* 27: 17–34.
- Robert, L, Labat-Robert, J, Robert, A-M (2009). Physiology of skin aging. *Pathol Biol* 57: 336–41.
- Rünger, TM, Quintanilla-Dieck, MJ, Bhawan, J (2007). Role of cathepsin K in the turnover of the dermal extracellular matrix during scar formation. *J Invest Dermatol* 127: 293–7.
- Sage, J, Leblanc-Noblesse, E, Nizard, C, *et al.* (2012). Cleavage of nidogen-1 by cathepsin s impairs its binding to basement membrane partners. *PLoS ONE* 7: e43494.
- Tobin, DJ, Foitzik, K, Reinheckel, T, *et al.* (2002). The lysosomal protease cathepsin L is an important regulator of keratinocyte and melanocyte differentiation during hair follicle morphogenesis and cycling. *Am J Pathol* 160: 1807–21.
- Vázquez, F, Palacios, S, Alemañ, N, *et al.* (1996). Changes of the basement membrane and type IV collagen in human skin during aging. *Maturitas* 25: 209–15.
- Xi, YP, Nette, EG, King, DW, *et al.* (1982). Age-related changes in normal human basement membrane. *Mech Ageing Dev* 19: 315–24.
- Yan, S, Sloane, BF (2003). Molecular regulation of human cathepsin B: implication in pathologies. *Biol Chem* 384: 845–54.

Zeeuwen, PLJM, Cheng, T, Schalkwijk, J (2009). The biology of cystatin M/E and its cognate target proteases. *J Invest Dermatol* 129: 1327–38.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Age-related changes in cathepsins, cystatins and ECM proteins in human skin.

(a) Immunofluorescence staining of cathepsins B, K, L, S and V in epidermis (arm, forearm), using specific polyclonal antibodies that recognize both pro- and mature forms to each cathepsins (Sage et al. 2012). Representative pictures of skin biopsies of young (19-27 years; average age: 21.6 ± 2.5 years; $n=10$) and aged donors (61-68 years; average age: 65.7 ± 3.2 years; $n=10$) are shown. Following confocal laser microscopy acquisition, pictures were analyzed and relative expression of cathepsins was quantified and standardized to the epidermis surface (Leica QWin software). (b) Relative expression levels of ECM proteins (elastin fibers) in the dermis and BM components (laminins-332/-511 and nidogen-1) in the DEJ. Respective oxytalan and dermal fibers expression was standardized to the upper dermis surface near to the dermal-epidermal junction and the deeper dermis surface. Quantification of basement membrane proteins expression was standardized to the dermal-epidermal junction surface. (c) Expression levels of cystatins A and M/E was quantified and standardized to the epidermis surface. Data are shown as individual points and horizontal bars indicate means. Statistical significance between young and aged donors was assessed using two-ways ANOVA (statistically significant differences are denoted with asterisks: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$). Scale bar = 25 μm . Ep: epidermis, De: dermis, Y: young, A: aged. Lam: laminin, Nid-1: nidogen-1. The dashed line indicates the BM.

Figure 2: Influence of age upon the expression and activity of cathepsin S in human epidermis extracts.

Epidermis was isolated from skin (breast, abdominal) of young (18-31 years; average age: 23 ± 5.7 ; $n=3$) and aged (62-71 years; average age: 66.3 ± 3.7 ; $n=3$) women and was pretreated in presence of protease inhibitors cocktail (0.5 mM Pefabloc SC, 0.5 mM EDTA, 1 mM MMTS, 0.04 mM pepstatin A). (a) Titration of total cathepsins in lysates was measured with E-64 (0-20 nM) before adding Z-Phe-Arg-AMC (20 μM) in 0.1 M acetate sodium buffer, pH 5.5, 5mM DTT, Brij35 0.01%. (b) Western-blot analysis of catS in epidermis extracts (60 μg protein) from young and aged skin donors. Ponceau staining is shown as a loading control. (c) Detection of specific catS activity in pretreated epidermis extracts after 1 h incubation at 37°C in 0.1 M phosphate sodium buffer, pH 7.4, 5 mM DTT, Brij 35 0.01% (Sage et al., 2012). Cathepsin S activity (relative fluorescence unit: RFU) was monitored using Z-Leu-Arg-AMC

(50 μ M). Error bars represent $\pm$ S.D. Statistical significance between young and aged donors was assessed using Student's two-ways test.

Figure S1: Influence of age upon the expression of cathepsins (mRNA, proteins and activity) in human keratinocytes supernatants.

(a) Primer sequences of cathepsins B, K, L, S and V and 16S ribosomal mRNA used in RT-PCR. (b) mRNA expression of cathepsins B, K, L, S and V in keratinocytes isolated from skin (breast, abdominal) of young (20-28 years; average age: 24 ± 4 ; $n=3$) and aged donors (59-71 years; average age: 63.3 ± 4.7 ; $n=3$) were quantified by real-time RT-PCR. Gene expression is normalized to the amount of ribosomal 16S RNA. Data are shown as mean $\pm$ S.D. (c) Concentrated keratinocytes supernatants (90 μ g protein) from young and aged skin donors were separated by SDS-PAGE (15%) under reducing conditions before anti-cathepsins immunodetection. Ponceau staining is shown as a loading control. (d) Titration of total cathepsins was obtained by incubated supernatants from young and aged donors 30 min at 37°C in 0.1 M acetate sodium buffer, pH 5.5, 5mM DTT, Brij35 0.01% with E-64 (0-20 nM) before adding Z-Phe-Arg-AMC (20 μ M). (e) Keratinocytes supernatants from young and aged donors were preincubated 1 h at 37°C in 0.1 M phosphate sodium buffer, pH 7.4, 5 mM DTT, Brij 35 0.01%. Specific cathepsin S activity (RFU) was monitored using Z-Leu-Arg-AMC (50 μ M). Error bars represent $\pm$ S.D. Statistical significance between young and aged donors was assessed using Student's two-ways test.

Figure S2: Influence of photoexposition on cathepsins expression in skin epidermis.

Skin biopsies (arm, forearm) of young (19-27 years; 21.6 ± 2.5 years; $n=10$; 2 zones PP+PE) and aged donors (61-68 years; 65.7 ± 3.2 years; $n=10$; 2 zones PP+PE) were incubated with anti-cathepsin B, K, L, S and V. Following confocal laser microscopy acquisition, pictures were analyzed and relative expression of cathepsins was quantified and standardized to epidermis surface. Data are shown as individual points and horizontal bars indicate means. Statistical significance between PP and PE donors was assessed using two-ways ANOVA (statistically significant difference is denoted with asterisk: *, $P<0.05$); PP: photoprotected; PE: photoexposed.

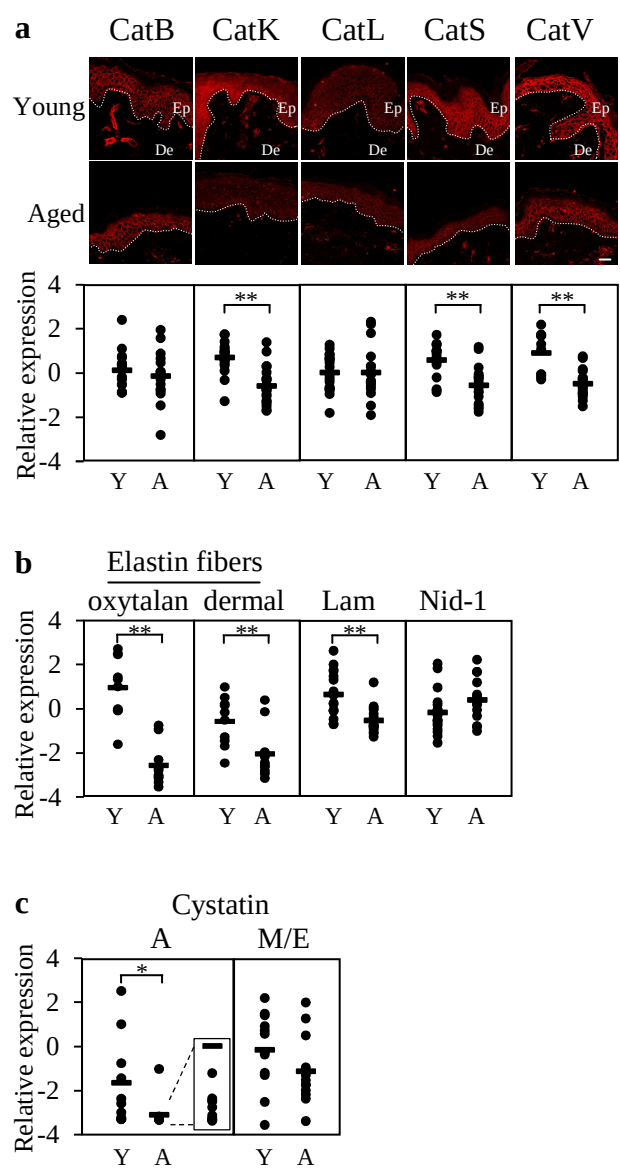


Figure 1: Sage et al.,

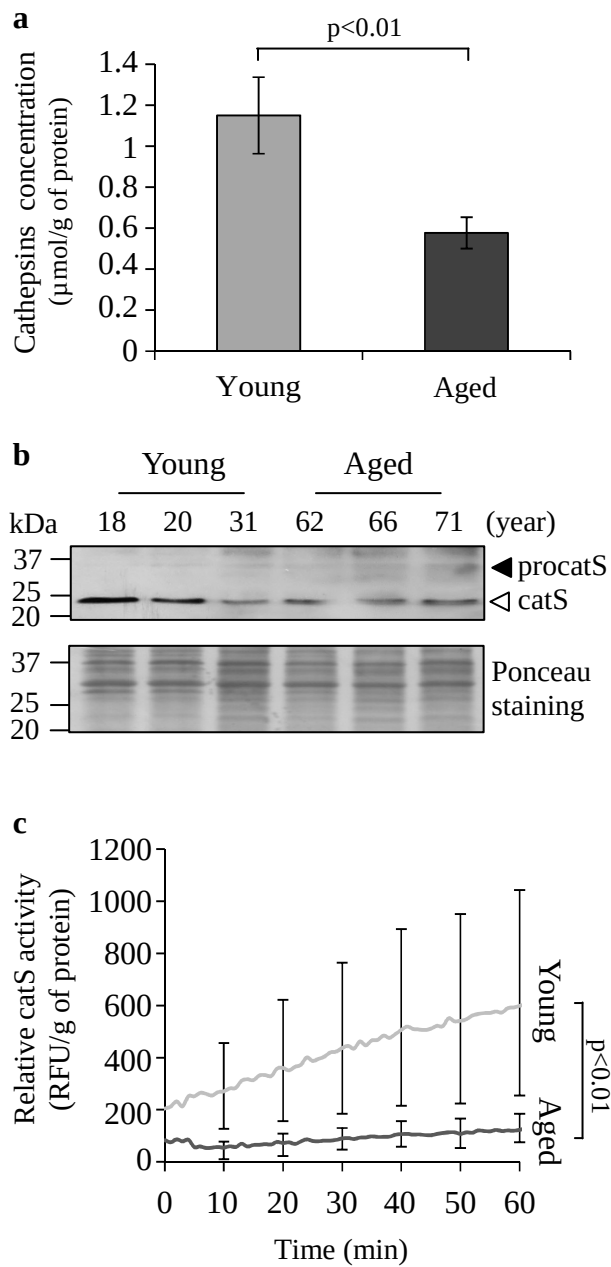


Figure 2: Sage et al.,

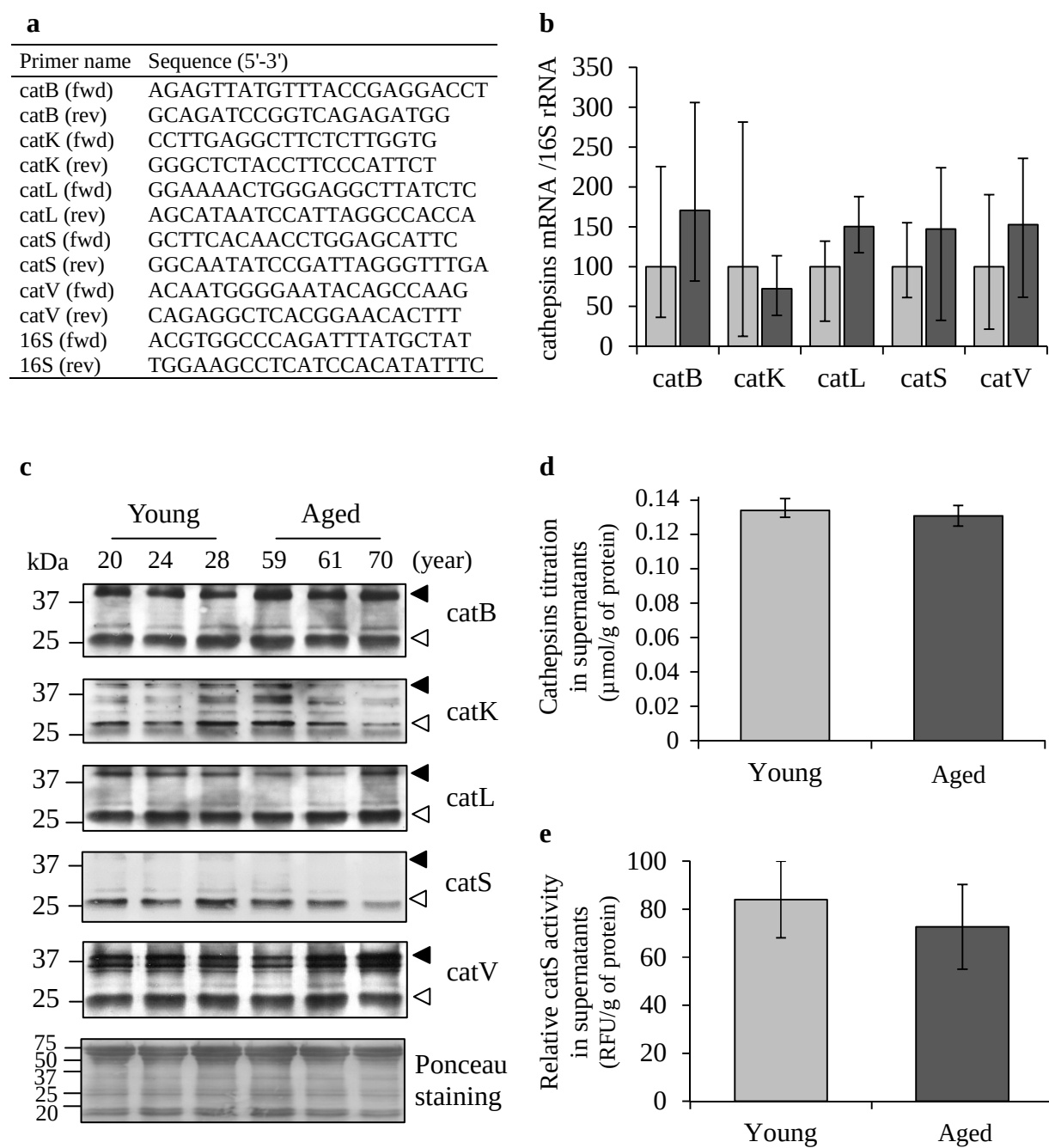


Figure S1 : Sage et al.,

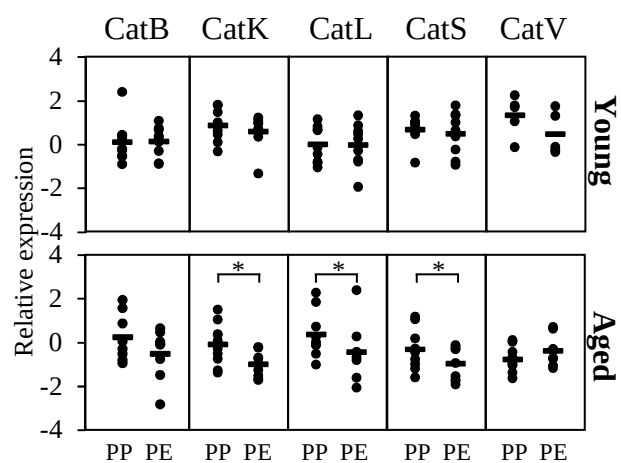


Figure S2 : Sage et al.,

Conclusion générale et perspectives

Avec l'âge, la peau perd de son élasticité et des rides apparaissent. Ces altérations morphologiques résultent de la dégradation excessive et de la désorganisation de larges structures de soutien présentes au niveau du derme, les fibres élastiques et de collagènes, et de la membrane basale. En effet, durant le vieillissement cutané certaines enzymes protéolytiques telles que les MMP et les protéases à sérine sont sur-exprimées, tandis que leurs inhibiteurs sont moins présents. Cela conduit à un déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases en faveur de la protéolyse, à l'origine de cette dégradation excessive. Bien que les cathepsines à cystéine soient capables de dégrader les constituants matriciels et de rester actives dans l'environnement extracellulaire sous certaines conditions, leur implication dans ce processus n'a été que très peu étudié. De plus, leurs cibles moléculaires au niveau de la membrane basale, et plus particulièrement celles de la cathepsine S qui dégrade une grande variété de substrats même à pH neutre, ne sont actuellement pas toutes identifiées. De par leur fort potentiel protéolytique, l'activité des cathepsines doit être régulée. L'un des modes de régulation de ces enzymes fait intervenir des glycosaminoglycanes, molécules présentes dans la matrice extracellulaire et à la surface des cellules. Alors que pour certaines d'entre elles (cathepsines B et K), ce mode de régulation est assez bien caractérisé, peu d'études ont fait état de la régulation de la cathepsine S par les glycosaminoglycanes.

Dans la peau, les cathepsines à cystéine sont localisées en grande majorité au niveau de l'épiderme (Schwarz *et al.*, 2002 ; Büth *et al.*, 2004). Au cours de cette thèse, nous avons montré que les principales cathepsines à cystéine humaines, les cathepsines B, K, L et S, sont exprimées par les kératinocytes et sécrétées dans le milieu extracellulaire sous forme de proformes et de formes actives. La cathepsine S pourrait agir au niveau de la JDE puisqu'elle est capable de dégrader *in vitro* tous les constituants de la membrane basale (laminine, collagène IV, perlécan et nidogène) même à pH 7,4 (pH proche de celui de la JDE) ; qu'ils soient isolés ou associés en réseau (membrane basale extraite du sarcome murin EHS). De façon intéressante, même lorsqu'il est complexé à la laminine, le nidogène-1 est rapidement et efficacement hydrolysé par la cathepsine S, alors qu'il est dans ces conditions moins sensible vis-à-vis des MMP et des protéases à sérine. Le clivage du nidogène-1 par la cathepsine S se fait à des sites différents de ceux décrits pour les MMP et protéases à sérine, dans les domaines G2 et G3 qui comportent les sites d'interaction avec ses différents partenaires, ce qui se traduit par une perte de l'élasticité et de la viscosité de la membrane basale. La cathepsine S pourrait ainsi intervenir aux côtés d'autres protéases dans l'hydrolyse et le remodelage de la membrane basale lors de processus physiologiques (renouvellement et

réparation tissulaires, angiogenèse) ou pathologiques (inflammation, cancer). L'équipe de G. P. Shi a montré précédemment que des cellules endothéliales de souris déficientes en cathepsine S ont un potentiel invasif à travers un modèle de membrane basale fortement réduit par rapport aux souris témoins, suite à une perte de leur capacité à en dégrader les principaux constituants (Shi *et al.*, 2003). De plus, la formation de nouveaux vaisseaux est perturbée. Ces travaux démontrent le rôle potentiel de la cathepsine S dans la dégradation de la membrane basale associée au phénomène d'angiogenèse. Par ailleurs, lors de processus inflammatoires, des facteurs pro-inflammatoires peuvent être sécrétés afin de stimuler la réponse immunitaire, tel que l'IFN- γ . Or l'expression et l'activité de la cathepsine S sont augmentées dans des kératinocytes en réponse à l'IFN- γ , à l'origine de leur transformation en cellules présentatrices d'antigènes non professionnelles (Schwarz *et al.*, 2002 ; Storm van's Gravesande *et al.*, 2002). En accord avec ces résultats, une sur-expression de la cathepsine S a été mise en évidence dans la peau de patients atteints de psoriasis et de dermatite atopique (Schönefuss *et al.*, 2010). Nous avons également observé dans notre étude une augmentation de la sécrétion de la cathepsine S par des kératinocytes humains normaux et des cellules HaCaT en réponse à l'IFN- γ , notamment en tant que proforme (résultats personnels non publiés). Afin de valider l'implication de la cathepsine S dans le remodelage de la membrane basale, nous pourrions regarder si la sur-expression de la cathepsine S induite par l'IFN- γ résulterait en une dégradation plus importante des constituants de la membrane basale. Nous pourrions également mettre en place une expérience de culture organotypique entre des fibroblastes cultivés dans une matrice de collagène et des kératinocytes humains dont le gène codant pour la cathepsine S aurait été éteint via des ARN interférents. Nous étudierions ainsi si l'inhibition de l'expression de cette enzyme protégerait, du moins en partie, l'hydrolyse du nidogène-1 au niveau de la JDE. L'utilisation de souris déficientes en cathepsine S ne nous permettrait probablement pas de répondre à cette question puisque ces souris sont viables et ne présentent pas d'altérations morphologiques au niveau cutané (Shi *et al.*, 1999b). Cependant, la sur-expression de la cathepsine S chez des souris entraîne un phénotype cutané semblable à la dermatite atopique (inflammation, hyperprolifération des kératinocytes, lésions) (Kim *et al.*, 2012). Il serait alors intéressant de regarder dans ce modèle animal si la membrane basale est affectée ou non par la sur-expression de la cathepsine S.

Du fait de sa capacité à dégrader les constituants de la matrice extracellulaire et de la membrane basale, la cathepsine S doit être correctement régulée afin d'éviter d'éventuels effets délétères. Les cathepsines sont régulées par différents paramètres tels que leur

propeptide, le pH, la température, la présence d'espèces réactives de l'oxygène, d'inhibiteurs endogènes ou encore de glycosaminoglycanes. Ces derniers, en interagissant via des liaisons électrostatiques avec les cathepsines, sont capables de réguler leur stabilité et leur activité protéolytique, comme précédemment démontré pour les cathepsines B, K, V et X. L'effet modulateur des glycosaminoglycanes sur l'activité de la cathepsine S a cependant été peu analysé et a fait alors l'objet d'une de nos études. Nous avons ainsi montré que parmi plusieurs GAG sulfatés (héparine, héparane sulfate, chondroïtines 4- et 6-sulfate, dermatane sulfate) et non sulfatés (acide hyaluronique), le C4-S interagit *in vitro* avec la cathepsine S, ce qui perturbe son activité peptidasique et protéolytique de façon dose-dépendante. La formation d'un complexe stable entre le C4-S et la cathepsine S a été révélée par chromatographie liquide. L'interaction a été mesurée par BIAcore, et a pour effet d'induire un changement de conformation de l'enzyme. Trois sites potentiels de fixation du C4-S ont été identifiés par modélisation moléculaire, dont l'un se situerait au niveau du site actif de l'enzyme (résidus Lys64 et Arg141). Le C4-S, en interagissant avec ces résidus, bloquerait par encombrement stérique l'accès d'un substrat au site actif de la cathepsine S, ce qui pourrait expliquer la diminution de son activité protéolytique que nous avons observée en présence de C4-S, notamment vis-à-vis du collagène IV. De la même façon, le C4-S semble perturber la capacité de la cathepsine S à dégrader les collagènes de type I et II (Li *et al.*, 2004). Des résultats préliminaires montrent que l'hydrolyse d'un modèle de membrane basale (EHS) par la cathepsine S est ralentie en présence de concentrations croissantes de C4-S (résultats personnels non publiés). Parmi les différentes protéines qui constituent cette membrane basale, la présence de C4-S protège en partie la dégradation du nidogène-1. Afin de valider cette étude, il serait intéressant de remplacer, par mutagenèse dirigée, les résidus basiques de la cathepsine S potentiellement impliqués dans l'interaction avec le C4-S par des résidus alanine. Le développement de mutants au niveau de chacun des 3 sites de fixation prédits, et d'un « super » mutant, muté pour les 3 sites, permettrait en effet une meilleure caractérisation du mécanisme de régulation de la cathepsine S par le C4-S. Comme le site de fixation du C4-S au niveau du site actif de la cathepsine S (site II) fait intervenir deux résidus (Lys64 et Arg141), il serait également intéressant de les muter séparément afin d'identifier le résidu critique à la régulation de l'activité de la cathepsine S par le C4-S.

Durant le processus de vieillissement cutané, la dégradation excessive des protéines matricielles à l'origine des rides et de la perte d'élasticité fait intervenir différentes classes de protéases (MMP, protéases à sérine). Les cathepsines étant exprimées dans la peau et

possédant un potentiel protéolytique important, il est surprenant que leur implication dans le processus de vieillissement cutané soit peu documenté. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à l'influence de l'âge sur l'expression et l'activité des principales cathepsines à cystéine B, K, L, S et V au niveau de l'épiderme. Nous avons mis en évidence par une étude d'immunofluorescence menée sur des biopsies de peaux prélevées au niveau des bras de femmes jeunes ($n=10$; $21,6 \pm 2,5$ ans) et âgées ($n=10$; $65,7 \pm 3,2$ ans) d'origine Caucasienne que l'expression protéique (proformes et formes matures) des cathepsines K, S et V diminue significativement avec l'âge ($p<0,01$). L'effet est augmenté avec la photo-exposition dans le cas des cathepsines K et S. L'expression des cathepsines B et L, qui sont ubiquitaires, ne varie pas au cours du vieillissement, mais chez les donneurs âgés la photo-exposition semble toutefois diminuer l'expression de la cathepsine L. De plus, le titre en cathepsines totales actives intracellulaires mesuré dans des lysats épidermiques diminue significativement avec l'âge ($p<0,05$), ce qui pourrait en partie expliquer l'accumulation de protéines non recyclées qui est observée durant le vieillissement. L'activité spécifique de la cathepsine S est également diminuée dans les lysats épidermiques issus de donneurs âgés, en corrélation avec la diminution de l'expression de sa forme mature. Afin de valider notre première étude portant sur l'hydrolyse de la membrane basale par la cathepsine S, des expériences complémentaires consisteraient à étudier, à partir de lysats épidermiques de donneurs jeunes et âgés, l'hydrolyse d'un modèle de membrane basale et plus particulièrement du nidogène-1 par les cathepsines. Nous pourrions également valider notre étude en comparant la migration à travers une membrane basale (EHS) entre des kératinocytes isolés de donneurs jeunes et de donneurs âgés.

En parallèle, l'influence de l'âge sur l'expression protéique des constituants de la membrane basale et des fibres élastiques du derme a été étudiée. Comme déjà établi, nous avons confirmé que la laminine et l'élastine des fibres oxytalanées et élastiques diminuent avec l'âge. Le statut du nidogène-1 durant le processus de vieillissement, bien qu'étudié dans d'autres organes comme la rétine pour laquelle il est augmenté chez la souris (Kunze *et al.*, 2010), n'a pas été reporté au niveau cutané. Notre étude montre que contrairement aux autres constituants, le nidogène-1 reste stable avec l'âge. Alors que les MMP et les protéases à sérine sont sur-exprimées durant le vieillissement, le nidogène-1 pourrait être protégé de leur action protéolytique car complexé avec les autres constituants de la membrane basale. Cela suggère que d'autres protéases pourraient être impliquées *in vivo* dans l'hydrolyse du nidogène-1, et nous avons montré que la cathepsine S serait une candidate potentielle. La diminution de

l'expression protéique des cathepsines K, S et V semble surprenante puisqu'avec le vieillissement l'expression d'autres classes de protéases augmente. En parallèle, le stress oxydatif qui est impliqué lors du vieillissement cutané pourrait inactiver les cathepsines via l'oxydation de la cystéine Cys25 du site actif et ainsi contribuer à leur dérégulation. À l'inverse, la plupart des pathologies liées à l'âge dans lesquelles les cathepsines sont impliquées (ostéoporose, arthrite rhumatoïde, athérosclérose) résultent de leur sur-expression. Malgré le stress oxydatif dans ces pathologies, l'activité des cathepsines est conservée, car en partie restaurée grâce à la présence de systèmes réducteurs comme la catalase (Godat *et al.*, 2008 ; Hervé-Grépinet *et al.*, 2008). La sur-expression des cathepsines dans ces pathologies pourrait être due à une régulation tissu-spécifique. Par exemple, la présence de GAG pourrait réguler leur expression, en plus de leur activité, comme cela a été reporté pour les MMP-2 et -9 qui sont alors sur-exprimées (Isnard *et al.*, 2003). Au cours du vieillissement, le contenu total en GAG sulfatés et en acide hyaluronique au niveau de l'épiderme diminue (Ghersetich *et al.*, 1994 ; Oh *et al.*, 2011). Cependant, aucune étude n'a montré s'il existe des différences d'expression entre les différents GAG sulfatés. Nous pourrions alors réaliser une étude immunohistochimique de l'expression du C4-S et de l'héparane sulfate dans l'épiderme au cours du vieillissement, à l'aide d'anticorps sélectifs disponibles commercialement (AMS Biotechnologies). Il serait intéressant de voir si la diminution de l'activité de la cathepsine S observée durant le vieillissement est corrélée avec le niveau d'expression du C4-S.

Ainsi, des molécules analogues de GAG pourraient être utilisées afin de corriger une dérégulation de l'expression de la cathepsine S, aussi bien dans le cadre d'un traitement thérapeutique (psoriasis, arthrite rhumatoïde) que dans une stratégie cosmétique de lutte anti-âge. Par ailleurs, certains GAG sont couramment utilisés en pharmaceutique et en dermo-cosmétique. En effet, l'acide hyaluronique est utilisé sous forme de pommades permettant de favoriser la cicatrisation de lésions, et en injection dans des pathologies comme l'arthrose où il est dégradé ou en médecine esthétique pour le comblement des rides, propriété pour laquelle il est également utilisé dans des crèmes anti-âge. Les chondroïtines sulfates sont également utilisés dans des traitements de l'arthrose où ils permettraient de ralentir la destruction du cartilage et d'activer la production de protéoglycanes par les chondrocytes.

Bien que cette thèse soit plus particulièrement axée sur la cathepsine S, d'autres cathepsines pourraient faire l'objet d'études approfondies. C'est l'exemple de la cathepsine V, qui au niveau de la peau est exprimée par les kératinocytes, notamment dans la couche cornée, où elle serait impliquée dans le processus de desquamation via la dégradation des

cornéodesmosomes. Cette enzyme possède par ailleurs une très forte activité protéolytique, notamment vis-à-vis de l'élastine, et peut être régulée par le C4-S et l'héparane sulfate (Yasuda *et al.*, 2004 ; résultats personnels non publiés). De plus, nous montrons ici que son expression dans l'épiderme diminue avec l'âge, ce qui pourrait en partie expliquer le ralentissement de la desquamation qui est observé durant le vieillissement cutané (Tagami, 2008).

Bibliographie

Bibliographie

A

Abrahamson, M. (1994). Cystatins. *Meth Enzymol* 244, 685–700.

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.

Abrahamson, M., Alvarez-Fernandez, M. & Nathanson, C.-M. (2003). Cystatins. *Biochem Soc Symp* 179–199.

Abreu-Velez, A. M. & Howard, M. S. (2012). Collagen IV in Normal Skin and in Pathological Processes. *N Am J Med Sci* 4, 1–8.

Adams-Cioaba, M. A., Krupa, J. C., Xu, C., Mort, J. S. & Min, J. (2011). Structural basis for the recognition and cleavage of histone H3 by cathepsin L. *Nat Commun* 2, 197.

Adhami, V. M., Afaq, F. & Ahmad, N. (2003). Suppression of ultraviolet B exposure-mediated activation of NF-kappaB in normal human keratinocytes by resveratrol. *Neoplasia* 5, 74–82.

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.

van Agtmael, T. & Bruckner-Tuderman, L. (2010). Basement membranes and human disease. *Cell Tissue Res* 339, 167–188.

van Agtmael, T., Schlötzer-Schrehardt, U., McKie, L., Brownstein, D. G., Lee, A. W., Cross, S. H., Sado, Y., Mullins, J. J., Pöschl, E. & Jackson, I. J. (2005). Dominant mutations of Col4a1 result in basement membrane defects which lead to anterior segment dysgenesis and glomerulopathy. *Hum Mol Genet* 14, 3161–3168.

Aibe, K., Yazawa, H., Abe, K., Teramura, K., Kumegawa, M., Kawashima, H. & Honda, K. (1996). Substrate specificity of recombinant osteoclast-specific cathepsin K from rabbits. *Biol Pharm Bull* 19, 1026–1031.

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.

Amano, S., Akutsu, N., Matsunaga, Y., Nishiyama, T., Champliand, M. F., Burgeson, R. E. & Adachi, E. (2001). Importance of balance between extracellular matrix synthesis and degradation in basement membrane formation. *Exp Cell Res* 271, 249–262.

- Amano, S. (2009). Possible involvement of basement membrane damage in skin photoaging. *J Invest Dermatol Symp Proc* 14, 2–7.
- Amenta, P. S., Scivoletti, N. A., Newman, M. D., Sciancalepore, J. P., Li, D. & Myers, J. C. (2005). Proteoglycan-collagen XV in human tissues is seen linking banded collagen fibers subjacent to the basement membrane. *J Histochem Cytochem* 53, 165–176.
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. & Hagen, T. M. (1995). Mitochondrial decay in aging. *Biochim Biophys Acta* 1271, 165–170.
- Anderson, S. & Brenner, B. M. (1986). Effects of aging on the renal glomerulus. *Am J Med* 80, 435–442.
- Arikawa-Hirasawa, E., Watanabe, H., Takami, H., Hassell, J. R. & Yamada, Y. (1999). Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat Genet* 23, 354–358.
- Arikawa-Hirasawa, E., Wilcox, W. R. & Yamada, Y. (2001). Dyssegmental dysplasia, Silverman-Handmaker type: unexpected role of perlecan in cartilage development. *Am J Med Genet* 106, 254–257.
- 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.
- Aubert, G. & Lansdorp, P. M. (2008). Telomeres and aging. *Physiol Rev* 88, 557–579.
- Aumailley, M. & Gayraud, B. (1998). Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J Mol Med* 76, 253–265.
- Aumailley, M. & Rousselle, P. (1999). Laminins of the dermo-epidermal junction. *Matrix Biol* 18, 19–28.
- Aumailley, M. & Smyth, N. (1998). The role of laminins in basement membrane function. *J Anat* 193 (Pt 1), 1–21.
- Aumailley, M., Wiedemann, H., Mann, K. & Timpl, R. (1989). Binding of nidogen and the laminin-nidogen complex to basement membrane collagen type IV. *Eur J Biochem* 184, 241–248.
- Aumailley, M., Battaglia, C., Mayer, U., Reinhardt, D., Nischt, R., Timpl, R. & Fox, J. W. (1993). Nidogen mediates the formation of ternary complexes of basement membrane components. *Kidney Int* 43, 7–12.
- Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W. G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E. & other authors. (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 24, 326–332.
- Avila, J. L. & Convit, J. (1975). Inhibition of leucocytic lysosomal enzymes by glycosaminoglycans in vitro. *Biochem J* 152, 57–64.



- Bader, B. L., Smyth, N., Nedbal, S., Miosge, N., Baranowsky, A., Mokkapati, S., Murshed, M. & Nischt, R. (2005). Compound genetic ablation of nidogen 1 and 2 causes basement membrane defects and perinatal lethality in mice. *Mol Cell Biol* 25, 6846–6856.

- Balasubramanian, S. & Eckert, R. L. (2007). Curcumin suppresses AP1 transcription factor-dependent differentiation and activates apoptosis in human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem* 282, 6707–6715.
- Barouki, R. (2006). [Ageing free radicals and cellular stress]. *Med Sci (Paris)* 22, 266–272.
- 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. & Starkey, P. M. (1973). The interaction of alpha 2-macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochem J* 133, 709–724.
- 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.
- Barrett, A. J., Fritz, H., Grubb, A., Isemura, S., Järvinen, M., Katunuma, N., Machleidt, W., Müller-Esterl, W., Sasaki, M. & Turk, V. (1986). Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. *Biochem J* 236, 312.
- Barry, Z. T. & Platt, M. O. (2012). Cathepsin S cannibalism of cathepsin K as a mechanism to reduce type I collagen degradation. *The Journal of biological chemistry*.
- Battaglia, C., Mayer, U., Aumailley, M. & Timpl, R. (1992). Basement-membrane heparan sulfate proteoglycan binds to laminin by its heparan sulfate chains and to nidogen by sites in the protein core. *Eur J Biochem* 208, 359–366.
- Bauza, E., Dal Farra, C., Portolan, F. & Domloge, N. (n.d.). New laminin peptide for innovative skin care cosmetics. *Cosmetics and toiletries* 118, 43–52.
- Bechtel, M., Keller, M. V., Bloch, W., Sasaki, T., Boukamp, P., Zaucke, F., Paulsson, M. & Nischt, R. (2012). Different domains in nidogen-1 and nidogen-2 drive basement membrane formation in skin organotypic cocultures. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*.
- Behrens, D. T., Villone, D., Koch, M., Brunner, G., Sorokin, L., Robenek, H., Bruckner-Tuderman, L., Bruckner, P. & Hansen, U. (2012). The epidermal basement membrane is a composite of separate laminin- or collagen IV-containing networks connected by aggregated perlecan, but not by nidogens. *J Biol Chem* 287, 18700–18709.
- Benavides, F., Giordano, M., Fiette, L., Bueno Brunialti, A. L., Martin Palenzuela, N., Vanzulli, S., Baldi, P., Schmidt, R., Dosne Pasqualini, C. & Guénet, J. (1999). Nackt (nkt), a new hair loss mutation of the mouse with associated CD4 deficiency. *Immunogenetics* 49, 413–419.
- Benavides, F., Starost, M. F., Flores, M., Gimenez-Conti, I. B., Guénet, J.-L. & Conti, C. J. (2002). Impaired hair follicle morphogenesis and cycling with abnormal epidermal differentiation in nackt mice, a cathepsin L-deficient mutation. *Am J Pathol* 161, 693–703.

- Benes, P., Vetvicka, V. & Fusek, M. (2008). Cathepsin D—Many functions of one aspartic protease. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 68, 12–28.
- Berdowska, I. (2004). Cysteine proteases as disease markers. *Clin Chim Acta* 342, 41–69.
- Bernard, D., Méhul, B., Thomas-Collignon, A., Simonetti, L., Remy, V., Bernard, M. A. & Schmidt, R. (2003). Analysis of proteins with caseinolytic activity in a human stratum corneum extract revealed a yet unidentified cysteine protease and identified the so-called ‘stratum corneum thiol protease’ as cathepsin I2. *J Invest Dermatol* 120, 592–600.
- Bernstein, E. F. & Uitto, J. (1996). The effect of photodamage on dermal extracellular matrix. *Clin Dermatol* 14, 143–151.
- Bernstein, E. F., Chen, Y. Q., Tamai, K., Shepley, K. J., Resnik, K. S., Zhang, H., Tuan, R., Mauviel, A. & Uitto, J. (1994). Enhanced elastin and fibrillin gene expression in chronically photodamaged skin. *J Invest Dermatol* 103, 182–186.
- Bernstein, E. F., Underhill, C. B., Hahn, P. J., Brown, D. B. & Uitto, J. (1996). Chronic sun exposure alters both the content and distribution of dermal glycosaminoglycans. *Br J Dermatol* 135, 255–262.
- Bevec, T., Stoka, V., Pungercic, G., Cazzulo, J. J. & Turk, V. (1997). A fragment of the major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain inhibits cruzipain, the major cysteine proteinase from *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett* 401, 259–261.
- Bikle, D. D. (2011). Vitamin D metabolism and function in the skin. *Mol Cell Endocrinol* 347, 80–89.
- Björk, I. & Ylinenjärvi, K. (1990). Interaction between chicken cystatin and the cysteine proteinases actinidin, chymopapain A, and ficin. *Biochemistry* 29, 1770–1776.
- Blanpain, C. & Fuchs, E. (2006). Epidermal stem cells of the skin. *Annu Rev Cell Dev Biol* 22, 339–373.
- 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., Thiele, U., Huber, R., Karshikov, A., Brzin, J., Kos, J. & Turk, V. (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.
- 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.
- Böse, K., Nischt, R., Page, A., Bader, B. L., Paulsson, M. & Smyth, N. (2006). Loss of nidogen-1 and -2 results in syndactyly and changes in limb development. *J Biol Chem* 281, 39620–39629.
- Bouwstra, J. A. & Ponc, M. (2006). The skin barrier in healthy and diseased state. *Biochim Biophys Acta* 1758, 2080–2095.
- Boyd, A. S., Naylor, M., Cameron, G. S., Pearse, A. D., Gaskell, S. A. & Neldner, K. H. (1995). The effects of chronic sunscreen use on the histologic changes of dermatoheliosis. *J Am Acad Dermatol* 33, 941–946.
- Bradshaw, A. D. & Sage, E. H. (2001). SPARC, a matricellular protein that functions in cellular differentiation and tissue response to injury. *Journal of Clinical Investigation* 107, 1049–1054.

- Braff, M. H., Bardan, A., Nizet, V. & Gallo, R. L. (2005). Cutaneous defense mechanisms by antimicrobial peptides. *J Invest Dermatol* 125, 9–13.
- Breitkreutz, D., Mirancea, N., Schmidt, C., Beck, R., Werner, U., Stark, H.-J., Gerl, M. & Fusenig, N. E. (2004). Inhibition of basement membrane formation by a nidogen-binding laminin gamma1-chain fragment in human skin-organotypic cocultures. *J Cell Sci* 117, 2611–2622.
- Briggaman, R. A., Dalldorf, F. G. & Wheeler, C. E., Jr. (1971). Formation and origin of basal lamina and anchoring fibrils in adult human skin. *J Cell Biol* 51, 384–395.
- Briggs, J. J., Haugen, M. H., Johansen, H. T., Riker, A. I., Abrahamson, M., Fodstad, Ø., Maeldandsmo, G. M. & Solberg, R. (2010). Cystatin E/M suppresses legumain activity and invasion of human melanoma. *BMC Cancer* 10, 17.
- 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.
- 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., 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., Okamoto, K., Wang, B. B. & Biroc, S. (1996a). 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., Klaus, J. L., Okamoto, K., Rasnick, D. & Palmer, J. T. (1996b). 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., 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.
- Brömme, D. & Lecaille, F. (2009). Cathepsin K inhibitors for osteoporosis and potential off-target effects. *Expert Opin Investig Drugs* 18, 585–600.
- Brown, K. W. & Parkinson, E. K. (1983). Glycoproteins and glycosaminoglycans of cultured normal human epidermal keratinocytes. *J Cell Sci* 61, 325–338.
- Bruckner-Tuderman, L., Schnyder, U. W., Winterhalter, K. H. & Bruckner, P. (1987). Tissue form of type VII collagen from human skin and dermal fibroblasts in culture. *Eur J Biochem* 165, 607–611.
- Brunk, U. T., Neuzil, J. & Eaton, J. W. (2001). Lysosomal involvement in apoptosis. *Redox Rep* 6, 91–97.
- Buck, M. R., Karustis, D. G., Day, N. A., Honn, K. V. & Sloane, B. F. (1992). Degradation of extracellular-matrix proteins by human cathepsin B from normal and tumour tissues. *Biochem J* 282 (Pt 1), 273–278.

Bühling, F., Gerber, A., Häckel, C., Krüger, S., Köhnlein, T., Brömme, D., Reinhold, D., Ansorge, S. & Welte, T. (1999). Expression of cathepsin K in lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20, 612–619.

Bühling, F., Waldburg, N., Reisenauer, A., Heimbürg, A., Golpon, H. & Welte, T. (2004). Lysosomal cysteine proteases in the lung: role in protein processing and immunoregulation. *Eur Respir J* 23, 620–628.

Burgeson, R. E. (1993). Type VII collagen, anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol* 101, 252–255.

Burns-Kurtis, C. L., Olzinski, A. R., Needle, S., Fox, J. H., Capper, E. A., Kelly, F. M., McQueney, M. S. & Romanic, A. M. (2004). Cathepsin S expression is up-regulated following balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit. *Cardiovasc Res* 62, 610–620.

Büth, H., Wolters, B., Hartwig, B., Meier-Bornheim, R., Veith, H., Hansen, M., Sommerhoff, C. P., Schaschke, N., Machleidt, W. & other authors. (2004). HaCaT keratinocytes secrete lysosomal cysteine proteinases during migration. *Eur J Cell Biol* 83, 781–795.

Büth, H., Luigi Buttigieg, P., Ostafe, R., Rehders, M., Dannenmann, S. R., Schaschke, N., Stark, H.-J., Boukamp, P. & Brix, K. (2007). Cathepsin B is essential for regeneration of scratch-wounded normal human epidermal keratinocytes. *Eur J Cell Biol* 86, 747–761.



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.

Cailhier, J.-F., Sirois, I., Laplante, P., Lepage, S., Raymond, M.-A., Brassard, N., Prat, A., Iozzo, R. V., Pshzhetsky, A. V. & Hébert, M.-J. (2008). Caspase-3 activation triggers extracellular cathepsin L release and endorepellin proteolysis. *J Biol Chem* 283, 27220–27229.

Candi, E., Schmidt, R. & Melino, G. (2005). The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 328–340.

Candiello, J., Cole, G. J. & Halfter, W. (2010). Age-dependent changes in the structure, composition and biophysical properties of a human basement membrane. *Matrix Biol* 29, 402–410.

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.

Cario-Andre, M., Lepreux, S., Pain, C., Nizard, C., Noblesse, E. & Taïeb, A. (2004). Perilesional vs. lesional skin changes in senile lentigo. *J Cutan Pathol* 31, 441–447.

Carlin, B., Jaffe, R., Bender, B. & Chung, A. E. (1981). Entactin, a novel basal lamina-associated sulfated glycoprotein. *J Biol Chem* 256, 5209–5214.

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.

- Carrard, G., Bulteau, A.-L., Petropoulos, I. & Friguet, B. (2002). Impairment of proteasome structure and function in aging. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 1461–1474.
- Casu, B., Guerrini, M. & Torri, G. (2004). Structural and conformational aspects of the anticoagulant and anti-thrombotic activity of heparin and dermatan sulfate. *Curr Pharm Des* 10, 939–949.
- Ceru, S., Konjar, S., Maher, K., Repnik, U., Krizaj, I., Bencina, M., Renko, M., Nepveu, A., Zerovnik, E. & other authors. (2010). Stefin B interacts with histones and cathepsin L in the nucleus. *J Biol Chem* 285, 10078–10086.
- Chahal, H. S. & Drake, W. M. (2007). The endocrine system and ageing. *J Pathol* 211, 173–180.
- Chakravarti, S., Tam, M. F. & Chung, A. E. (1990). The basement membrane glycoprotein entactin promotes cell attachment and binds calcium ions. *J Biol Chem* 265, 10597–10603.
- Chan, L. L. Y., Cheung, B. K. W., Li, J. C. B. & Lau, A. S. Y. (2010). A role for STAT3 and cathepsin S in IL-10 down-regulation of IFN-gamma-induced MHC class II molecule on primary human blood macrophages. *J Leukoc Biol* 88, 303–311.
- Chapman, H. A., Riese, R. J. & Shi, G. P. (1997). Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* 59, 63–88.
- Chen, N., Seiberg, M. & Lin, C. B. (2006). Cathepsin L2 levels inversely correlate with skin color. *J Invest Dermatol* 126, 2345–2347.
- Chen, Q. & Ames, B. N. (1994). Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 4130–4134.
- Cheng, T., Hitomi, K., van Vlijmen-Willems, I. M. J. J., de Jongh, G. J., Yamamoto, K., Nishi, K., Watts, C., Reinheckel, T., Schalkwijk, J. & Zeeuwen, P. L. J. M. (2006). Cystatin M/E is a high affinity inhibitor of cathepsin V and cathepsin L by a reactive site that is distinct from the legumain-binding site. A novel clue for the role of cystatin M/E in epidermal cornification. *J Biol Chem* 281, 15893–15899.
- 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.
- Choe, Y., Leonetti, F., Greenbaum, D. C., Lecaille, F., Bogoy, M., Brömme, D., Ellman, J. A. & Craik, C. S. (2006). Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities. *J Biol Chem* 281, 12824–12832.
- Chowdhury, S. F., Sivaraman, J., Wang, J., Devanathan, G., Lachance, P., Qi, H., Ménard, R., Lefebvre, J., Konishi, Y. & other authors. (2002). Design of noncovalent inhibitors of human cathepsin L. From the 96-residue proregion to optimized tripeptides. *J Med Chem* 45, 5321–5329.
- 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.
- Clemens, T. L., Adams, J. S., Henderson, S. L. & Holick, M. F. (1982). Increased skin pigment reduces the capacity of skin to synthesise vitamin D3. *Lancet* 1, 74–76.
- Codriansky, K. A., Quintanilla-Dieck, M. J., Gan, S., Keady, M., Bhawan, J. & Rünger, T. M. (2009). Intracellular degradation of elastin by cathepsin K in skin fibroblasts—a possible role in photoaging. *Photochem Photobiol* 85, 1356–1363.

Colman, R. W., Jameson, B. A., Lin, Y., Johnson, D. & Mousa, S. A. (2000). Domain 5 of high molecular weight kininogen (kininostat) down-regulates endothelial cell proliferation and migration and inhibits angiogenesis. *Blood* 95, 543–550.

Costell, M., Mann, K., Yamada, Y. & Timpl, R. (1997). Characterization of recombinant perlecan domain I and its substitution by glycosaminoglycans and oligosaccharides. *Eur J Biochem* 243, 115–121.

Costell, M., Gustafsson, E., Aszódi, A., Mörgelin, M., Bloch, W., Hunziker, E., Addicks, K., Timpl, R. & Fässler, R. (1999). Perlecan maintains the integrity of cartilage and some basement membranes. *J Cell Biol* 147, 1109–1122.

Cotta-Pereira, G., Guerra Rodrigo, F. & Bittencourt-Sampaio, S. (1976). Oxytalan, elaunin, and elastic fibers in the human skin. *J Invest Dermatol* 66, 143–148.

Craven, N. M., Watson, R. E., Jones, C. J., Shuttleworth, C. A., Kielty, C. M. & Griffiths, C. E. (1997). Clinical features of photodamaged human skin are associated with a reduction in collagen VII. *Br J Dermatol* 137, 344–350.

Cygler, M. & Mort, J. S. (1997). Proregion structure of members of the papain superfamily. Mode of inhibition of enzymatic activity. *Biochimie* 79, 645–652.

D

Dahl, S. W., Halkier, T., Lauritzen, C., Dolenc, I., Pedersen, J., Turk, V. & Turk, B. (2001). Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing. *Biochemistry* 40, 1671–1678.

Dale, B. A., Holbrook, K. A. & Steinert, P. M. (1978). Assembly of stratum corneum basic protein and keratin filaments in macrofibrils. *Nature* 276, 729–731.

Dedhar, S., Jewell, K., Rojiani, M. & Gray, V. (1992). The receptor for the basement membrane glycoprotein entactin is the integrin $\alpha 3/\beta 1$. *J Biol Chem* 267, 18908–18914.

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.

Dennhöfer, R., Kurschat, P., Zigrino, P., Klose, A., Bosserhoff, A., van Muijen, G., Krieg, T., Mauch, C. & Hunzelmann, N. (2003). Invasion of melanoma cells into dermal connective tissue in vitro: evidence for an important role of cysteine proteases. *Int J Cancer* 106, 316–323.

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.

Dong, L. J., Hsieh, J. C. & Chung, A. E. (1995). Two distinct cell attachment sites in entactin are revealed by amino acid substitutions and deletion of the RGD sequence in the cysteine-rich epidermal growth factor repeat 2. *J Biol Chem* 270, 15838–15843.

Drake, F. H., Dodds, R. A., James, I. E., Connor, J. R., Debouck, C., Richardson, S., Lee-Rykaczewski, E., Coleman, L., Rieman, D. & other authors. (1996). Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts. *J Biol Chem* 271, 12511–12516.

Duncan, E. M., Muratore-Schroeder, T. L., Cook, R. G., Garcia, B. A., Shabanowitz, J., Hunt, D. F. & Allis, C. D. (2008). Cathepsin L proteolytically processes histone H3 during mouse embryonic stem cell differentiation. *Cell* 135, 284–294.

Dunn, A. D., Crutchfield, H. E. & Dunn, J. T. (1991). Thyroglobulin processing by thyroidal proteases. Major sites of cleavage by cathepsins B, D, and L. *J Biol Chem* 266, 20198–20204.

Durbeej, M. (2010). Laminins. *Cell Tissue Res* 339, 259–268.

Dziadek, M. & Timpl, R. (1985). Expression of nidogen and laminin in basement membranes during mouse embryogenesis and in teratocarcinoma cells. *Dev Biol* 111, 372–382.

Dziadek, M., Paulsson, M. & Timpl, R. (1985). Identification and interaction repertoire of large forms of the basement membrane protein nidogen. *EMBO J* 4, 2513–2518.

Dziadek, M., Paulsson, M., Aumailley, M. & Timpl, R. (1986). Purification and tissue distribution of a small protein (BM-40) extracted from a basement membrane tumor. *Eur J Biochem* 161, 455–464.

Dziadek, M., Clements, R., Mitrangas, K., Reiter, H. & Fowler, K. (1988). Analysis of degradation of the basement membrane protein nidogen, using a specific monoclonal antibody. *Eur J Biochem* 172, 219–225.



Eckert, R. L., Sturniolo, M. T., Broome, A.-M., Ruse, M. & Rorke, E. A. (2005). Transglutaminase function in epidermis. *J Invest Dermatol* 124, 481–492.

El Ghalbzouri, A., Jonkman, M. F., Dijkman, R. & Ponc, M. (2005). Basement membrane reconstruction in human skin equivalents is regulated by fibroblasts and/or exogenously activated keratinocytes. *J Invest Dermatol* 124, 79–86.

El-Domyati, M., Attia, S., Saleh, F., Brown, D., Birk, D. E., Gasparro, F., Ahmad, H. & Uitto, J. (2002). Intrinsic aging vs. photoaging: a comparative histopathological, immunohistochemical, and ultrastructural study of skin. *Exp Dermatol* 11, 398–405.

Elias, P. M. (1983). Epidermal lipids, barrier function, and desquamation. *J Invest Dermatol* 80, 44s–9s.

Engel, J., Odermatt, E., Engel, A., Madri, J. A., Furthmayr, H., Rohde, H. & Timpl, R. (1981). Shapes, domain organizations and flexibility of laminin and fibronectin, two multifunctional proteins of the extracellular matrix. *J Mol Biol* 150, 97–120.

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.

Esser, R. E., Angelo, R. A., Murphey, M. D., Watts, L. M., Thornburg, L. P., Palmer, J. T., Talhouk, J. W. & Smith, R. E. (1994). Cysteine proteinase inhibitors decrease articular cartilage and bone destruction in chronic inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 37, 236–247.

Everts, V., Aronson, D. C. & Beertsen, W. (1985). Phagocytosis of bone collagen by osteoclasts in two cases of pycnodysostosis. *Calcif Tissue Int* 37, 25–31.



Falgueyret, J. P., Oballa, R. M., Okamoto, O., Wesolowski, G., Aubin, Y., Rydzewski, R. M., Prasit, P., Riendeau, D., Rodan, S. B. & Percival, M. D. (2001). Novel, nonpeptidic cyanamides as potent and reversible inhibitors of human cathepsins K and L. *J Med Chem* 44, 94–104.

Ferreras, M., Felbor, U., Lenhard, T., Olsen, B. R. & Delaissé, J.-M. (2000). Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Letters* 486, 247–251.

Fine, J.-D., Eady, R. A. J., Bauer, E. A., Bauer, J. W., Bruckner-Tuderman, L., Heagerty, A., Hintner, H., Hovnanian, A., Jonkman, M. F. & other authors. (2008). The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): Report of the Third International Consensus Meeting on Diagnosis and Classification of EB. *J Am Acad Dermatol* 58, 931–950.

Fisher, G. J., Datta, S. C., Talwar, H. S., Wang, Z. Q., Varani, J., Kang, S. & Voorhees, J. J. (1996). Molecular basis of sun-induced premature skin ageing and retinoid antagonism. *Nature* 379, 335–339.

Fisher, G. J., Wang, Z. Q., Datta, S. C., Varani, J., Kang, S. & Voorhees, J. J. (1997). Pathophysiology of premature skin aging induced by ultraviolet light. *N Engl J Med* 337, 1419–1428.

Fisher, G. J., Talwar, H. S., Lin, J. & Voorhees, J. J. (1999). Molecular mechanisms of photoaging in human skin in vivo and their prevention by all-trans retinoic acid. *Photochem Photobiol* 69, 154–157.

Fitzpatrick, R. E. & Rostan, E. F. (2002). Double-blind, half-face study comparing topical vitamin C and vehicle for rejuvenation of photodamage. *Dermatol Surg* 28, 231–236.

Fleischmajer, R., Schechter, A., Bruns, M., Perlish, J. S., Macdonald, E. D., Pan, T. C., Timpl, R. & Chu, M. L. (1995). Skin fibroblasts are the only source of nidogen during early basal lamina formation in vitro. *J Invest Dermatol* 105, 597–601.

Fox, J. W., Mayer, U., Nischt, R., Aumailley, M., Reinhardt, D., Wiedemann, H., Mann, K., Timpl, R., Krieg, T. & Engel, J. (1991). Recombinant nidogen consists of three globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV. *EMBO J* 10, 3137–3146.

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.

Frenkel, J. S. (2012). The role of hyaluronan in wound healing. *Int Wound J*.

Frey, J. B. (1995). What dwarfed Toulouse-Lautrec? *Nat Genet* 10, 128–130.

Frick, I.-M., Akesson, P., Herwald, H., Mörgelin, M., Malmsten, M., Nögler, D. K. & Björck, L. (2006). The contact system—a novel branch of innate immunity generating antibacterial peptides. *EMBO J* 25, 5569–5578.

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.

Fröhlich, E., Schlagenhauff, B., Möhrle, M., Weber, E., Klessen, C. & Rassner, G. (2001). Activity, expression, and transcription rate of the cathepsins B, D, H, and L in cutaneous malignant melanoma. *Cancer* 91, 972–982.

Fuchs, E. & Raghavan, S. (2002). Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nature Reviews Genetics* 3, 199–209.



Gandhi, N. S. & Mancera, R. L. (2008). The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chem Biol Drug Des* 72, 455–482.

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.

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.

Gelb, B. D., Shi, G. P., Heller, M., Weremowicz, S., Morton, C., Desnick, R. J. & Chapman, H. A. (1997). Structure and chromosomal assignment of the human cathepsin K gene. *Genomics* 41, 258–262.

Gersh, I. & Catchpole, H. R. (1949). The organization of ground substance and basement membrane and its significance in tissue injury, disease and growth. *American Journal of Anatomy* 85, 457–521.

Ghersetich, I., Lotti, T., Campanile, G., Grappone, C. & Dini, G. (1994). Hyaluronic acid in cutaneous intrinsic aging. *Int J Dermatol* 33, 119–122.

Ghohestani, R. F., Li, K., Rousselle, P. & Uitto, J. (2001). Molecular organization of the cutaneous basement membrane zone. *Clin Dermatol* 19, 551–562.

Ghosh, M. C., Grass, L., Soosaipillai, A., Sotiropoulou, G. & Diamandis, E. P. (2004). Human kallikrein 6 degrades extracellular matrix proteins and may enhance the metastatic potential of tumour cells. *Tumour Biol* 25, 193–199.

Giannelli, G., Falk-Marzillier, J., Schiraldi, O., Stetler-Stevenson, W. G. & Quaranta, V. (1997). Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* 277, 225–228.

Gilchrest, B. A., Murphy, G. F. & Soter, N. A. (1982). Effect of chronologic aging and ultraviolet irradiation on Langerhans cells in human epidermis. *J Invest Dermatol* 79, 85–88.

Gillet, L., Roger, S., Besson, P., Lecaille, F., Gore, J., Bougnoux, 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.

Gocheva, V. & Joyce, J. A. (2007). Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle* 6, 60–64.

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.

- Gombart, A. F., Borregaard, N. & Koeffler, H. P. (2005). Human cathelicidin antimicrobial peptide (CAMP) gene is a direct target of the vitamin D receptor and is strongly up-regulated in myeloid cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *FASEB J* 19, 1067–1077.
- Gong, Q., Chan, S. J., Bajkowski, A. S., Steiner, D. F. & Frankfater, A. (1993). Characterization of the cathepsin B gene and multiple mRNAs in human tissues: evidence for alternative splicing of cathepsin B pre-mRNA. *DNA Cell Biol* 12, 299–309.
- Gonzales, M., Haan, K., Baker, S. E., Fitchmun, M., Todorov, I., Weitzman, S. & Jones, J. C. (1999). A cell signal pathway involving laminin-5, alpha3beta1 integrin, and mitogen-activated protein kinase can regulate epithelial cell proliferation. *Mol Biol Cell* 10, 259–270.
- Gould, D. B., Phalan, F. C., Breedveld, G. J., Mil, S. E. van, Smith, R. S., Schimenti, J. C., Aguglia, U., Knaap, M. S. van der, Heutink, P. & John, S. W. M. (2005). Mutations in Col4a1 Cause Perinatal Cerebral Hemorrhage and Porencephaly. *Science* 308, 1167–1171.
- Goulet, B., Baruch, A., Moon, N.-S., Poirier, M., Sansregret, L. L., Erickson, A., Bogyo, 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.
- Green, E. L. (1954). Quantitative genetics of skeletal variations in the mouse. I. Crosses between three short-ear strains (P, NB, SEC/2). *J Natl Cancer Inst* 15, 609–627.
- Groffen, A. J., Ruegg, M. A., Dijkman, H., van de Velden, T. J., Buskens, C. A., van den Born, J., Assmann, K. J., Monnens, L. A., Veerkamp, J. H. & van den Heuvel, L. P. (1998). Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan in the human glomerular basement membrane. *J Histochem Cytochem* 46, 19–27.
- Gronski, T. J., Jr, Martin, R. L., Kobayashi, D. K., Walsh, B. C., Holman, M. C., Huber, M., Van Wart, H. E. & Shapiro, S. D. (1997). Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. *J Biol Chem* 272, 12189–12194.
- Grove, G. L. & Kligman, A. M. (1983). Age-associated changes in human epidermal cell renewal. *J Gerontol* 38, 137–142.
- Guaní-Guerra, E., Santos-Mendoza, T., Lugo-Reyes, S. O. & Terán, L. M. (2010). Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol* 135, 1–11.
- Guay, J., Falgueyret, J. P., Ducret, A., Percival, M. D. & Mancini, J. A. (2000). Potency and selectivity of inhibition of cathepsin K, L and S by their respective propeptides. *Eur J Biochem* 267, 6311–6318.
- Gubler, M. C. (2008). Inherited diseases of the glomerular basement membrane. *Nat Clin Pract Nephrol* 4, 24–37.
- 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.

Guncar, G., Podobnik, M., Pungercar, J., Strukelj, B., Turk, V. & Turk, D. (1998). Crystal structure of porcine cathepsin H determined at 2.1 Å resolution: location of the mini-chain C-terminal carboxyl group defines cathepsin H aminopeptidase function. *Structure* 6, 51–61.

Gupta, S., Singh, R. K., Dastidar, S. & Ray, A. (2008). Cysteine cathepsin S as an immunomodulatory target: present and future trends. *Expert Opin Ther Targets* 12, 291–299.

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.

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.

H

Hagemann, S., Günther, T., Dennemärker, J., Lohmüller, T., Brömme, D., Schüle, R., Peters, C. & Reinheckel, T. (2004). The human cysteine protease cathepsin V can compensate for murine cathepsin L in mouse epidermis and hair follicles. *Eur J Cell Biol* 83, 775–780.

Halangk, W., Lerch, M. M., Brandt-Nedele, B., Roth, W., Ruthenbueger, M., Reinheckel, T., Domschke, W., Lippert, H., Peters, C. & Deussing, J. (2000). Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest* 106, 773–781.

Halata, Z., Grim, M. & Baumann, K. I. (2003). [The Merkel cell: morphology, developmental origin, function]. *Cas Lek Cesk* 142, 4–9.

Hamano, Y., Zeisberg, M., Sugimoto, H., Lively, J. C., Maeshima, Y., Yang, C., Hynes, R. O., Werb, Z., Sudhakar, A. & Kalluri, R. (2003). Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. *Cancer Cell* 3, 589–601.

Härle-Bachor, C. & Boukamp, P. (1996). Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and in immortal and carcinoma-derived skin keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 6476–6481.

Hart, T. C., Hart, P. S., Bowden, D. W., Michalec, M. D., Callison, S. A., Walker, S. J., Zhang, Y. & Firatli, E. (1999). Mutations of the cathepsin C gene are responsible for Papillon-Lefèvre syndrome. *J Med Genet* 36, 881–887.

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.

Hashmi, S. & Marinkovich, M. P. (2011). Molecular organization of the basement membrane zone. *Clin Dermatol* 29, 398–411.

Hassell, J. R., Robey, P. G., Barrach, H. J., Wilczek, J., Rennard, S. I. & Martin, G. R. (1980). Isolation of a heparan sulfate-containing proteoglycan from basement membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 4494–4498.

- Helbling-Leclerc, A., Zhang, X., Topaloglu, H., Cruaud, C., Tesson, F., Weissenbach, J., Tomé, F. M. S., Schwartz, K., Fardeau, M. & other authors. (1995). Mutations in the laminin $\alpha 2$ -chain gene (LAMA2) cause merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *Nature Genetics* 11, 216–218.
- Henskens, Y. M., Veerman, E. C. & Nieuw Amerongen, A. V. (1996). Cystatins in health and disease. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 377, 71–86.
- Herrmann, G., Wlaschek, M., Lange, T. S., Prenzel, K., Goerz, G. & Scharffetter-Kochanek, K. (1993). UVA irradiation stimulates the synthesis of various matrix-metalloproteinases (MMPs) in cultured human fibroblasts. *Exp Dermatol* 2, 92–97.
- 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.
- Hiwasa, T., Sakiyama, S., Yokoyama, S., Ha, J. M., Fujita, J., Noguchi, S., Bando, Y., Kominami, E. & Katunuma, N. (1988). Inhibition of cathepsin L-induced degradation of epidermal growth factor receptors by c-Ha-ras gene products. *Biochem Biophys Res Commun* 151, 78–85.
- Hofmann, H., Voss, T., Kühn, K. & Engel, J. (1984). Localization of flexible sites in thread-like molecules from electron micrographs. Comparison of interstitial, basement membrane and intima collagens. *J Mol Biol* 172, 325–343.
- Honey, K. & Rudensky, A. Y. (2003). Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 3, 472–482.
- Hook, V., Toneff, T., Bogyo, M., Greenbaum, D., Medzihradsky, 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. Y. H., Kindy, M. & Hook, G. (2008). Inhibitors of cathepsin B improve memory and reduce beta-amyloid in transgenic Alzheimer disease mice expressing the wild-type, but not the Swedish mutant, beta-secretase site of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* 283, 7745–7753.
- Hopf, M., Göhring, W., Kohfeldt, E., Yamada, Y. & Timpl, R. (1999). Recombinant domain IV of perlecan binds to nidogens, laminin-nidogen complex, fibronectin, fibulin-2 and heparin. *Eur J Biochem* 259, 917–925.
- Hornebeck, W. (2003). Down-regulation of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival. *Pathol Biol* 51, 569–573.
- 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.
- 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, B. G., Tryggvason, K., Sundaramoorthy, M. & Neilson, E. G. (2003). Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen. *N Engl J Med* 348, 2543–2556.

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.

Huet, E., Brassart, B., Wallach, J., Debelle, L., Haye, B., Emonard, H. & Hornebeck, W. (2001). [Effect of elastin peptides on the production of matrix metalloproteinase 2 by human skin fibroblasts in culture]. *J Soc Biol* 195, 165–172.

Hull, M. T. & Warfel, K. A. (1983). Age-related changes in the cutaneous basal lamina: scanning electron microscopic study. *J Invest Dermatol* 81, 378–380.

Humbert, P. G., Haftek, M., Creidi, P., Lapière, C., Nusgens, B., Richard, A., Schmitt, D., Rougier, A. & Zahouani, H. (2003). Topical ascorbic acid on photoaged skin. Clinical, topographical and ultrastructural evaluation: double-blind study vs. placebo. *Exp Dermatol* 12, 237–244.



Iozzo, R. V. (2005). Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 646–656.

Ishida-Yamamoto, A. & Kishibe, M. (2011). Involvement of corneodesmosome degradation and lamellar granule transportation in the desquamation process. *Med Mol Morphol* 44, 1–6.

Ishidoh, K. & Kominami, E. (1994). Multi-step processing of procathepsin L in vitro. *FEBS Lett* 352, 281–284.

Ishidoh, K. & Kominami, E. (1998). Gene regulation and extracellular functions of procathepsin L. *Biol Chem* 379, 131–135.

Ishisaka, R., Utsumi, T., Yabuki, M., Kanno, T., Furuno, T., Inoue, M. & Utsumi, K. (1998). Activation of caspase-3-like protease by digitonin-treated lysosomes. *FEBS Lett* 435, 233–236.

Isnard, N., Robert, L. & Renard, G. (2003). Effect of sulfated GAGs on the expression and activation of MMP-2 and MMP-9 in corneal and dermal explant cultures. *Cell Biol Int* 27, 779–784.



Jean, D., Guillaume, N. & Frade, R. (2002). Characterization of human cathepsin L promoter and identification of binding sites for NF-Y, Sp1 and Sp3 that are essential for its activity. *Biochem J* 361, 173–184.

Jeanmaire, C., Danoux, L. & Pauly, G. (2001). Glycation during human dermal intrinsic and actinic ageing: an in vivo and in vitro model study. *Br J Dermatol* 145, 10–18.

Jimenez-Mallebrera, C., Brown, S. C., Sewry, C. A. & Muntoni, F. (2005). Congenital muscular dystrophy: molecular and cellular aspects. *Cell Mol Life Sci* 62, 809–823.

Just, M., Ribera, M., Monsó, E., Lorenzo, J. C. & Ferrándiz, C. (2007). Effect of smoking on skin elastic fibres: morphometric and immunohistochemical analysis. *Br J Dermatol* 156, 85–91.

Jutras, I. & Reudelhuber, T. L. (1999). Prorenin processing by cathepsin B in vitro and in transfected cells. *FEBS Lett* 443, 48–52.



Kadono, S., Manaka, I., Kawashima, M., Kobayashi, T. & Imokawa, G. (2001). The role of the epidermal endothelin cascade in the hyperpigmentation mechanism of lentigo senilis. *J Invest Dermatol* 116, 571–577.

Kadunce, D. P., Burr, R., Gress, R., Kanner, R., Lyon, J. L. & Zone, J. J. (1991). Cigarette smoking: risk factor for premature facial wrinkling. *Ann Intern Med* 114, 840–844.

Kafi, R., Kwak, H. S. R., Schumacher, W. E., Cho, S., Hanft, V. N., Hamilton, T. A., King, A. L., Neal, J. D., Varani, J. & other authors. (2007). Improvement of naturally aged skin with vitamin A (retinol). *Arch Dermatol* 143, 606–612.

Kafienah, W., Brömme, D., Buttle, D. J., Croucher, L. J. & Hollander, A. P. (1998). Human cathepsin K cleaves native type I and II collagens at the N-terminal end of the triple helix. *Biochem J* 331 (Pt 3), 727–732.

Kagan, H. M. & Sullivan, K. A. (1982). Lysyl oxidase: preparation and role in elastin biosynthesis. *Meth Enzymol* 82 Pt A, 637–650.

Kalinin, A. E., Kajava, A. V. & Steinert, P. M. (2002). Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope. *Bioessays* 24, 789–800.

Kalluri, R., Cantley, L. G., Kerjaschki, D. & Neilson, E. G. (2000). Reactive oxygen species expose cryptic epitopes associated with autoimmune goodpasture syndrome. *J Biol Chem* 275, 20027–20032.

Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 3, 422–433.

Kalluri, R. (2003). U.S Patent 2003/0119739A1.

Kaplan, J. & Nielsen, M. L. (1979). Analysis of macrophage surface receptors. I. Binding of alpha-macroglobulin . protease complexes to rabbit alveolar macrophages. *J Biol Chem* 254, 7323–7328.

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., Lecaillon, F. & Lalmanach, G. (2011). Cysteine Cathepsins: Markers and Therapy Targets in Lung Disorders. *Clinical Reviews 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. & other authors. (1999). Structure based development of novel specific inhibitors for cathepsin L and cathepsin S in vitro and in vivo. *FEBS Lett* 458, 6–10.

- Katunuma, N. (2010). Posttranslational processing and modification of cathepsins and cystatins. *J Signal Transduct* 2010, 375345.
- Katzberg, A. A. (1958). The area of the dermo-epidermal junction in human skin. *The Anatomical Record* 131, 717–725.
- Kawada, A., Hara, K., Hiruma, M., Noguchi, H. & Ishibashi, A. (1995). Rat epidermal cathepsin L-like proteinase: purification and some hydrolytic properties toward filaggrin and synthetic substrates. *J Biochem* 118, 332–337.
- Kefalides, N. A. (1973). Structure and biosynthesis of basement membranes. *Int Rev Connect Tissue Res* 6, 63–104.
- 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.
- Khalfan, H. A. (1991). Study of thiol proteases of normal human skin fibroblasts. *Cell Biochem Funct* 9, 55–62.
- Khoshnoodi, J., Cartailier, J.-P., Alvares, K., Veis, A. & Hudson, B. G. (2006). Molecular Recognition in the Assembly of Collagens: Terminal Noncollagenous Domains Are Key Recognition Modules in the Formation of Triple Helical Protomers. *J Biol Chem* 281, 38117–38121.
- Khoshnoodi, J., Pedchenko, V. & Hudson, B. G. (2008). Mammalian collagen IV. *Microsc Res Tech* 71, 357–370.
- Kielty, C. M., Sherratt, M. J. & Shuttleworth, C. A. (2002). Elastic fibres. *J Cell Sci* 115, 2817–2828.
- Kim, G. K. (2010). The rationale behind topical vitamin d analogs in the treatment of psoriasis: where does topical calcitriol fit in? *J Clin Aesthet Dermatol* 3, 46–53.
- Kim, H. C., Lewis, M. S., Gorman, J. J., Park, S. C., Girard, J. E., Folk, J. E. & Chung, S. I. (1990). Protransglutaminase E from guinea pig skin. Isolation and partial characterization. *J Biol Chem* 265, 21971–21978.
- Kim, N., Bae, K. B., Kim, M. O., Yu, D. H., Kim, H. J., Yuh, H. S., Ji, Y. R., Park, S. J., Kim, S. & other authors. (2012). Overexpression of cathepsin S induces chronic atopic dermatitis in mice. *J Invest Dermatol* 132, 1169–1176.
- Kimura, N., Toyoshima, T., Kojima, T. & Shimane, M. (1998). Entactin-2: a new member of basement membrane protein with high homology to entactin/nidogen. *Exp Cell Res* 241, 36–45.
- King, I. A. (1981). Characterization of epidermal glycosaminoglycans synthesized in organ culture. *Biochim Biophys Acta* 674, 87–95.
- Kirschke, H., Wiederanders, B., Brömme, D. & Rinne, A. (1989). Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochem J* 264, 467–473.
- Kirschke, H., Barrett, A. J. & Rawlings, N. D. (1995). Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile* 2, 1581–1643.

- Kirwan, M. & Dokal, I. (2008). Dyskeratosis congenita: a genetic disorder of many faces. *Clin Genet* 73, 103–112.
- Klein, T. & Bischoff, R. (2010). Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* 41, 271–290.
- Kleniewski, J. & Czokało, M. (1991). Plasma kininogen concentration: the low level in cord blood plasma and age dependence in adults. *Eur J Haematol* 46, 257–262.
- Knöll, R., Postel, R., Wang, J., Krätzner, R., Hennecke, G., Vacaru, A. M., Vakeel, P., Schubert, C., Murthy, K. & other authors. (2007). Laminin- α 4 and integrin-linked kinase mutations cause human cardiomyopathy via simultaneous defects in cardiomyocytes and endothelial cells. *Circulation* 116, 515–525.
- Koh, J. S., Kang, H., Choi, S. W. & Kim, H. O. (2002). Cigarette smoking associated with premature facial wrinkling: image analysis of facial skin replicas. *Int J Dermatol* 41, 21–27.
- Kohen, R. & Gati, I. (2000). Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. *Toxicology* 148, 149–157.
- Kohfeldt, E., Sasaki, T., Göhring, W. & Timpl, R. (1998). Nidogen-2: a new basement membrane protein with diverse binding properties. *J Mol Biol* 282, 99–109.
- Kohl, E., Steinbauer, J., Landthaler, M. & Szeimies, R.-M. (2011). Skin ageing. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 25, 873–884.
- Kondo, S., Kooshesh, F. & Sauder, D. N. (1997). Penetration of keratinocyte-derived cytokines into basement membrane. *J Cell Physiol* 171, 190–195.
- König, A. & Bruckner-Tuderman, L. (1992). Transforming growth factor- β stimulates collagen VII expression by cutaneous cells in vitro. *J Cell Biol* 117, 679–685.
- Kopitar, G., Dolinar, M., Strukelj, B., Pungercar, J. & Turk, V. (1996). Folding and activation of human procathepsin S from inclusion bodies produced in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 236, 558–562.
- Kos, J. & Lah, T. T. (1998). Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy in cancer (review). *Oncol Rep* 5, 1349–1361.
- Koshikawa, N., Minegishi, T., Sharabi, A., Quaranta, V. & Seiki, M. (2005). Membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) is a processing enzyme for human laminin gamma 2 chain. *J Biol Chem* 280, 88–93.
- Kostoulas, G., Lang, A., Nagase, H. & Baici, A. (1999). Stimulation of angiogenesis through cathepsin B inactivation of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *FEBS Lett* 455, 286–290.
- Krantz, A. (1994). Peptidyl (acyloxy)methanes as quiescent affinity labels for cysteine proteinases. *Meth Enzymol* 244, 656–671.
- 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.
- Kunze, A., Abari, E., Semkova, I., Paulsson, M. & Hartmann, U. (2010). Deposition of nidogens and other basement membrane proteins in the young and aging mouse retina. *Ophthalmic Res* 43, 108–112.

Kvist, A. J., Johnson, A. E., Mörgelin, M., Gustafsson, E., Bengtsson, E., Lindblom, K., Aszódi, A., Fässler, R., Sasaki, T. & other authors. (2006). Chondroitin sulfate perlecan enhances collagen fibril formation. Implications for perlecan chondrodysplasias. *J Biol Chem* 281, 33127–33139.

L

Labat-Robert, J., Fourtanier, A., Boyer-Lafargue, B. & Robert, L. (2000). Age dependent increase of elastase type protease activity in mouse skin. Effect of UV-irradiation. *J Photochem Photobiol B, Biol* 57, 113–118.

Lai, W., Zheng, Y., Ye, Z., Su, X., Wan, M., Gong, Z., Xie, X. & Liu, W. (2010). Changes of cathepsin B in human photoaging skin both in vivo and in vitro. *Chin Med J* 123, 527–531.

Lai, Y. & Gallo, R. L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol* 30, 131–141.

Lalmanach, G., Naudin, C., Lecaille, F. & Fritz, H. (2010). Kininogens: More than cysteine protease inhibitors and kinin precursors. *Biochimie* 92, 1568–1579.

Lavker, R. M. (1979). Structural alterations in exposed and unexposed aged skin. *J Invest Dermatol* 73, 59–66.

LeBleu, V. S., Macdonald, B. & Kalluri, R. (2007). Structure and function of basement membranes. *Exp Biol Med (Maywood)* 232, 1121–1129.

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

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

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

Lechner, A. M., Assfalg-Machleidt, I., Zahler, S., Stoeckelhuber, M., Machleidt, W., Jochum, M. & Nögler, D. K. (2006). RGD-dependent binding of procathepsin X to integrin α v β 3 mediates cell-adhesive properties. *J Biol Chem* 281, 39588–39597.

Lee-Dutra, A., Wiener, D. K. & Sun, S. (2011). Cathepsin S inhibitors: 2004-2010. *Expert Opin Ther Pat* 21, 311–337.

Leeman, M. F., Curran, S. & Murray, G. I. (2002). The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37, 149–166.

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.

- 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.
- Lenarcic, B., Krishnan, G., Borukhovich, R., Ruck, B., Turk, V. & Moczydlowski, E. (2000). Saxiphilin, a saxitoxin-binding protein with two thyroglobulin type 1 domains, is an inhibitor of papain-like cysteine proteinases. *J Biol Chem* 275, 15572–15577.
- Le Varlet, B., Chaudagne, C., Saunois, A., Barré, P., Sauvage, C., Berthouloux, B., Meybeck, A., Dumas, M. & Bonté, F. (1998). Age-related functional and structural changes in human dermo-epidermal junction components. *J Investig Dermatol Symp Proc* 3, 172–179.
- Li, K., Tamai, K., Tan, E. M. & Uitto, J. (1993). Cloning of type XVII collagen. Complementary and genomic DNA sequences of mouse 180-kilodalton bullous pemphigoid antigen (BPAG2) predict an interrupted collagenous domain, a transmembrane segment, and unusual features in the 5'-end of the gene and the 3'-untranslated region of the mRNA. *J Biol Chem* 268, 8825–8834.
- Li, Q. & Bever, C. T., Jr. (1996). Gamma interferon induced increases in intracellular cathepsin B activity in PMA primed THP-1 cells are blocked by inhibitors of protein kinase C. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 18, 375–396.
- Li, Z., Hou, W. S. & Brömme, D. (2000). Collagenolytic activity of cathepsin K is specifically modulated by cartilage-resident chondroitin sulfates. *Biochemistry* 39, 529–536.
- 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.
- Li, Z., Kienetz, M., Cherney, M. M., James, M. N. G. & Brömme, D. (2008). The crystal and molecular structures of a cathepsin K:chondroitin sulfate complex. *J Mol Biol* 383, 78–91.
- Lin, J. Y. & Fisher, D. E. (2007). Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445, 843–850.
- Lin, J.-Y., Selim, M. A., Shea, C. R., Grichnik, J. M., Omar, M. M., Monteiro-Riviere, N. A. & Pinnell, S. R. (2003). UV photoprotection by combination topical antioxidants vitamin C and vitamin E. *J Am Acad Dermatol* 48, 866–874.
- Linke, M., Jordans, S., Mach, L., Herzog, V. & Brix, K. (2002). Thyroid stimulating hormone upregulates secretion of cathepsin B from thyroid epithelial cells. *Biol Chem* 383, 773–784.
- 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.
- 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.

Liuzzo, J. P., Petanceska, S. S., Moscatelli, D. & Devi, L. A. (1999). Inflammatory mediators regulate cathepsin S in macrophages and microglia: A role in attenuating heparan sulfate interactions. *Mol Med* 5, 320–333.

López-Otín, C. & Bond, J. S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *J Biol Chem* 283, 30433–30437.

Lu, P., Takai, K., Weaver, V. M. & Werb, Z. (2011). Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.

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.

M

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.

MacNeil, S. (2007). Progress and opportunities for tissue-engineered skin. *Nature* 445, 874–880.

Madison, K. C. (2003). Barrier function of the skin: ‘la raison d’être’ of the epidermis. *J Invest Dermatol* 121, 231–241.

Magklara, A., Mellati, A. A., Wasney, G. A., Little, S. P., Sotiropoulou, G., Becker, G. W. & Diamandis, E. P. (2003). Characterization of the enzymatic activity of human kallikrein 6: autoactivation, substrate specificity, and regulation by inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 307, 948–955.

Mai, J., Finley, R. L., Jr, Waisman, D. M. & Sloane, B. F. (2000). Human procathepsin B interacts with the annexin II tetramer on the surface of tumor cells. *J Biol Chem* 275, 12806–12812.

Mallya, S. K., Hall, J. E., Lee, H. M., Roemer, E. J., Simon, S. R. & Golub, L. M. (1994). Interaction of matrix metalloproteinases with serine protease inhibitors. New potential roles for matrix metalloproteinase inhibitors. *Ann N Y Acad Sci* 732, 303–314.

Mann, K., Deutzmann, R. & Timpl, R. (1988). Characterization of proteolytic fragments of the laminin-nidogen complex and their activity in ligand-binding assays. *Eur J Biochem* 178, 71–80.

Maquart, F.-X., Brézillon, S. & Wegrowski, Y. (2010). Proteoglycans in Skin Aging. In *Textbook of Aging Skin*, pp. 109–120. Edited by M. A. Farage, K. W. Miller & H. I. Maibach. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

Marekov, L. N. & Steinert, P. M. (1998). Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope. *J Biol Chem* 273, 17763–17770.

Marinkovich, M. P., Keene, D. R., Rimberg, C. S. & Burgeson, R. E. (1993). Cellular origin of the dermal-epidermal basement membrane. *Dev Dyn* 197, 255–267.

Marionnet, C., Pierrard, C., Vioux-Chagnoleau, C., Sok, J., Asselineau, D. & Bernerd, F. (2006). Interactions between fibroblasts and keratinocytes in morphogenesis of dermal epidermal junction in a model of reconstructed skin. *J Invest Dermatol* 126, 971–979.

- Marneros, A. G. & Olsen, B. R. (2005). Physiological role of collagen XVIII and endostatin. *FASEB J* 19, 716–728.
- Martin, P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75–81.
- Marx, J. (2003). Angiogenesis. A boost for tumor starvation. *Science* 301, 452–454.
- Mason, R. W. & Massey, S. D. (1992). Surface activation of pro-cathepsin L. *Biochem Biophys Res Commun* 189, 1659–1666.
- Masunaga, T., Shimizu, H., Yee, C., Borradori, L., Lazarova, Z., Nishikawa, T. & Yancey, K. B. (1997). The extracellular domain of BPAG2 localizes to anchoring filaments and its carboxyl terminus extends to the lamina densa of normal human epidermal basement membrane. *J Invest Dermatol* 109, 200–206.
- Maverakis, E., Miyamura, Y., Bowen, M. P., Correa, G., Ono, Y. & Goodarzi, H. (2010). Light, including ultraviolet. *J Autoimmun* 34, J247–257.
- Mayer, U., Mann, K., Timpl, R. & Murphy, G. (1993). Sites of nidogen cleavage by proteases involved in tissue homeostasis and remodelling. *Eur J Biochem* 217, 877–884.
- McCullough, J. L. & Kelly, K. M. (2006). Prevention and treatment of skin aging. *Ann N Y Acad Sci* 1067, 323–331.
- McGrath, J. A., Eady, R. a. J. & Pope, F. M. (2008). Anatomy and Organization of Human Skin. In *Rook's Textbook of Dermatology*, pp. 45–128.
- 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.
- McKee, K. K., Harrison, D., Capizzi, S. & Yurchenco, P. D. (2007). Role of laminin terminal globular domains in basement membrane assembly. *J Biol Chem* 282, 21437–21447.
- McMillan, J. R., Akiyama, M. & Shimizu, H. (2003). Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions. *J Dermatol Sci* 31, 169–177.
- 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.
- Michel, M., Török, N., Godbout, M. J., Lussier, M., Gaudreau, P., Royal, A. & Germain, L. (1996). Keratin 19 as a biochemical marker of skin stem cells in vivo and in vitro: keratin 19 expressing cells are differentially localized in function of anatomic sites, and their number varies with donor age and culture stage. *J Cell Sci* 109 (Pt 5), 1017–1028.
- Miner, J. H., Li, C., Mudd, J. L., Go, G. & Sutherland, A. E. (2004). Compositional and structural requirements for laminin and basement membranes during mouse embryo implantation and gastrulation. *Development* 131, 2247–2256.
- Miosge, N., Sasaki, T. & Timpl, R. (2002). Evidence of nidogen-2 compensation for nidogen-1 deficiency in transgenic mice. *Matrix Biol* 21, 611–621.

Mohamed, M. M. & Sloane, B. F. (2006). Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 764–775.

Mokkapati, S., Baranowsky, A., Mirancea, N., Smyth, N., Breitkreutz, D. & Nischt, R. (2008). Basement membranes in skin are differently affected by lack of nidogen 1 and 2. *J Invest Dermatol* 128, 2259–2267.

Mooney, A., Jackson, K., Bacon, R., Streuli, C., Edwards, G., Bassuk, J. & Savill, J. (1999). Type IV collagen and laminin regulate glomerular mesangial cell susceptibility to apoptosis via beta(1) integrin-mediated survival signals. *Am J Pathol* 155, 599–606.

Murray, J. C., Burch, J. A., Streilein, R. D., Iannacchione, M. A., Hall, R. P. & Pinnell, S. R. (2008). A topical antioxidant solution containing vitamins C and E stabilized by ferulic acid provides protection for human skin against damage caused by ultraviolet irradiation. *J Am Acad Dermatol* 59, 418–425.

Murshed, M., Smyth, N., Miosge, N., Karolat, J., Krieg, T., Paulsson, M. & Nischt, R. (2000). The absence of nidogen 1 does not affect murine basement membrane formation. *Mol Cell Biol* 20, 7007–7012.

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.



Nagaoka, Y., Otsu, K., Okada, F., Sato, K., Ohba, Y., Kotani, N. & Fujii, J. (2005). Specific inactivation of cysteine protease-type cathepsin by singlet oxygen generated from naphthalene endoperoxides. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 215–223.

Nägler, D. K. & Ménard, 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.

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, S., Pawelek, P. & Grinnell, F. (1989). Extracellular matrix organization modulates fibroblast growth and growth factor responsiveness. *Exp Cell Res* 182, 572–582.

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 Ii 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. & other authors. (1999). Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* 10, 207–217.

- Nascimento, F. D., Rizzi, C. C. A., Nantes, I. L., Stefe, I., Turk, B., Carmona, A. K., Nader, H. B., Juliano, L. & Tersariol, I. L. S. (2005). Cathepsin X binds to cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Arch Biochem Biophys* 436, 323–332.
- Naudin, C., Lecaillon, F., Chowdhury, S., Krupa, J. C., Purisima, E., Mort, J. S. & Lalmanach, G. (2010). The occluding loop of cathepsin B prevents its effective inhibition by human kininogens. *J Mol Biol* 400, 1022–1035.
- Naylor, E. C., Watson, R. E. B. & Sherratt, M. J. (2011). Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas* 69, 249–256.
- Nelson, W. G. & Sun, T. T. (1983). The 50- and 58-kdalton keratin classes as molecular markers for stratified squamous epithelia: cell culture studies. *J Cell Biol* 97, 244–251.
- Nestle, F. O., Kaplan, D. H. & Barker, J. (2009). Psoriasis. *N Engl J Med* 361, 496–509.
- Neubauer, K., Krüger, M., Quondamatteo, F., Knittel, T., Saile, B. & Ramadori, G. (1999). Transforming growth factor-beta1 stimulates the synthesis of basement membrane proteins laminin, collagen type IV and entactin in rat liver sinusoidal endothelial cells. *J Hepatol* 31, 692–702.
- 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.
- Nicole, S., Davoine, C. S., Topaloglu, H., Cattolico, L., Barral, D., Beighton, P., Hamida, C. B., Hammouda, H., Cruaud, C. & other authors. (2000). Perlecan, the major proteoglycan of basement membranes, is altered in patients with Schwartz-Jampel syndrome (chondrodystrophic myotonia). *Nat Genet* 26, 480–483.
- Nischt, R., Schmidt, C., Mirancea, N., Baranowsky, A., Mokkapati, S., Smyth, N., Woenne, E. C., Stark, H.-J., Boukamp, P. & Breitkreutz, D. (2007). Lack of nidogen-1 and -2 prevents basement membrane assembly in skin-organotypic coculture. *J Invest Dermatol* 127, 545–554.
- Nishimura, Y., Kawabata, T. & Kato, K. (1988). Identification of latent procathepsins B and L in microsomal lumen: characterization of enzymatic activation and proteolytic processing in vitro. *Arch Biochem Biophys* 261, 64–71.
- Nissler, K., Strubel, W., Kreusch, S., Rommerskirch, W., Weber, E. & Wiederanders, B. (1999). The half-life of human procathepsin S. *Eur J Biochem* 263, 717–725.
- Noakes, P. G., Miner, J. H., Gautam, M., Cunningham, J. M., Sanes, J. R. & Merlie, J. P. (1995). The renal glomerulus of mice lacking s-laminin/laminin beta 2: nephrosis despite molecular compensation by laminin beta 1. *Nat Genet* 10, 400–406.
- Noblesse, E., Nizard, C., Cario-André, M., Lepreux, S., Pain, C., Schnebert, S., Taïeb, A. & Kurfurst, R. (2006). Skin ultrastructure in senile lentigo. *Skin Pharmacol Physiol* 19, 95–100.
- Noonan, D. M., Fulle, A., Valente, P., Cai, S., Horigan, E., Sasaki, M., Yamada, Y. & Hassell, J. R. (1991). The complete sequence of perlecan, a basement membrane heparan sulfate proteoglycan, reveals extensive similarity with laminin A chain, low density lipoprotein-receptor, and the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem* 266, 22939–22947.
- Nuckolls, G. H. & Slavkin, H. C. (1999). Paths of glorious proteases. *Nat Genet* 23, 378–380.

Nusgens, B.-V. (2010). [Hyaluronic acid and extracellular matrix: a primitive molecule?]. *Ann Dermatol Venereol* 137 Suppl 1, S3–8.



Obiezu, C. V., Michael, I. P., Levesque, M. A. & Diamandis, E. P. (2006). Human kallikrein 4: enzymatic activity, inhibition, and degradation of extracellular matrix proteins. *Biol Chem* 387, 749–759.

Oh, J.-H., Kim, Y. K., Jung, J.-Y., Shin, J., Kim, K. H., Cho, K. H., Eun, H. C. & Chung, J. H. (2011). Intrinsic aging- and photoaging-dependent level changes of glycosaminoglycans and their correlation with water content in human skin. *J Dermatol Sci* 62, 192–201.

Ohman, H. & Vahlquist, A. (1994). In vivo studies concerning a pH gradient in human stratum corneum and upper epidermis. *Acta Derm Venereol* 74, 375–379.

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.

Oörni, K., Sneck, 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.

Orkin, R. W., Gehron, P., McGoodwin, E. B., Martin, G. R., Valentine, T. & Swarm, R. (1977). A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J Exp Med* 145, 204–220.

Ott, U., Odermatt, E., Engel, J., Furthmayr, H. & Timpl, R. (1982). Protease resistance and conformation of laminin. *Eur J Biochem* 123, 63–72.

Otto, H.-H. & Schirmeister, T. (1997). Cysteine Proteases and Their Inhibitors. *Chem Rev* 97, 133–172.



Page-McCaw, A., Ewald, A. J. & Werb, Z. (2007). Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 221–233.

Pageon, H. (2010). Reaction of glycation and human skin: the effects on the skin and its components, reconstructed skin as a model. *Pathol Biol* 58, 226–231.

Palermo, C. & Joyce, J. A. (2008). Cysteine cathepsin proteases as pharmacological targets in cancer. *Trends Pharmacol Sci* 29, 22–28.

Palmer, C. N. A., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S. P., Goudie, D. R., Sandilands, A., Campbell, L. E. & other authors. (2006). Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat Genet* 38, 441–446.

- 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.
- Palungwachira, P., Kakuta, M., Yamazaki, M., Yaguchi, H., Tsuboi, R., Takamori, K. & Ogawa, H. (2002). Immunohistochemical localization of cathepsin L and cystatin A in normal skin and skin tumors. *J Dermatol* 29, 573–579.
- Pandya, N. M., Dhalla, N. S. & Santani, D. D. (2006). Angiogenesis--a new target for future therapy. *Vascul Pharmacol* 44, 265–274.
- Pankov, R. & Yamada, K. M. (2002). Fibronectin at a glance. *J Cell Sci* 115, 3861–3863.
- Passeron, T. & Ortonne, J.-P. (2003). [Skin ageing and its prevention]. *Presse Med* 32, 1474–1482.
- Paulsson, M., Deutzmann, R., Dziadek, M., Nowack, H., Timpl, R., Weber, S. & Engel, J. (1986). Purification and structural characterization of intact and fragmented nidogen obtained from a tumor basement membrane. *Eur J Biochem* 156, 467–478.
- Paulsson, M., Aumailley, M., Deutzmann, R., Timpl, R., Beck, K. & Engel, J. (1987). Laminin-nidogen complex. Extraction with chelating agents and structural characterization. *Eur J Biochem* 166, 11–19.
- Percival, M. D., Ouellet, M., Campagnolo, C., Claveau, D. & Li, C. (1999). Inhibition of cathepsin K by nitric oxide donors: evidence for the formation of mixed disulfides and a sulfenic acid. *Biochemistry* 38, 13574–13583.
- 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.
- Petanceska, S., Canoll, P. & Devi, L. A. (1996). Expression of rat cathepsin S in phagocytic cells. *J Biol Chem* 271, 4403–4409.
- 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.
- Pham, C. T. N., Ivanovich, J. L., Raptis, S. Z., Zehnbauser, B. & Ley, T. J. (2004). Papillon-Lefèvre syndrome: correlating the molecular, cellular, and clinical consequences of cathepsin C/dipeptidyl peptidase I deficiency in humans. *J Immunol* 173, 7277–7281.
- Pillai, S., Oresajo, C. & Hayward, J. (2005). Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation - a review. *Int J Cosmet Sci* 27, 17–34.
- Pöschl, E., Schlötzer-Schrehardt, U., Brachvogel, B., Saito, K., Ninomiya, Y. & Mayer, U. (2004). Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* 131, 1619–1628.
- Potts, W., Bowyer, J., Jones, H., Tucker, D., Freemont, A. J., Millest, A., Martin, C., Vernon, W., Neerunjun, D. & other authors. (2004). Cathepsin L-deficient mice exhibit abnormal skin and bone development and show increased resistance to osteoporosis following ovariectomy. *Int J Exp Pathol* 85, 85–96.
- Prost-Squarcioni, C. (2006). [Histology of skin and hair follicle]. *Med Sci (Paris)* 22, 131–137.
- Pulkkinen, L. & Uitto, J. (1999). Mutation analysis and molecular genetics of epidermolysis bullosa. *Matrix Biol* 18, 29–42.

Pungercic, G., Dolenc, I., Dolinar, M., Bevec, T., Jenko, S., Kolaric, S. & Turk, V. (2002). Individual recombinant thyroglobulin type-1 domains are substrates for lysosomal cysteine proteinases. *Biol Chem* 383, 1809–1812.

Punturieri, A., Filippov, S., Allen, E., Caras, I., Murray, R., Reddy, V. & Weiss, S. J. (2000). Regulation of elastinolytic cysteine proteinase activity in normal and cathepsin K-deficient human macrophages. *J Exp Med* 192, 789–799.



Quan, T., Qin, Z., Xia, W., Shao, Y., Voorhees, J. J. & Fisher, G. J. (2009). Matrix-degrading metalloproteinases in photoaging. *J Invest Dermatol Symp Proc* 14, 20–24.

Quintanilla-Dieck, M. J., Codriansky, K., Keady, M., Bhawan, J. & Rünger, T. M. (2008). Cathepsin K in melanoma invasion. *J Invest Dermatol* 128, 2281–2288.

Quintanilla-Dieck, M. J., Codriansky, K., Keady, M., Bhawan, J. & Rünger, T. M. (2009). Expression and regulation of cathepsin K in skin fibroblasts. *Exp Dermatol* 18, 596–602.



Rafal, E. S., Griffiths, C. E., Ditre, C. M., Finkel, L. J., Hamilton, T. A., Ellis, C. N. & Voorhees, J. J. (1992). Topical tretinoin (retinoic acid) treatment for liver spots associated with photodamage. *N Engl J Med* 326, 368–374.

Rajapakse, S. & Takahashi, T. (2007). Expression and enzymatic characterization of recombinant human kallikrein 14. *Zool Sci* 24, 774–780.

Rajapakse, S., Ogiwara, K., Takano, N., Moriyama, A. & Takahashi, T. (2005). Biochemical characterization of human kallikrein 8 and its possible involvement in the degradation of extracellular matrix proteins. *FEBS Letters* 579, 6879–6884.

Rawlings, A. V. & Harding, C. R. (2004). Moisturization and skin barrier function. *Dermatol Ther* 17 Suppl 1, 43–48.

Rawlings, N. D. & Barrett, A. J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 290 (Pt 1), 205–218.

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. (2012). MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* 40, D343–350.

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.

Reddy, V. B., Shimada, S. G., Sikand, P., Lamotte, R. H. & Lerner, E. A. (2010). Cathepsin S elicits itch and signals via protease-activated receptors. *J Invest Dermatol* 130, 1468–1470.

- Reinheckel, T., Hagemann, S., Dollwet-Mack, S., Martinez, E., Lohmüller, T., Zlatkovic, G., Tobin, D. J., Maas-Szabowski, N. & Peters, C. (2005). The lysosomal cysteine protease cathepsin L regulates keratinocyte proliferation by control of growth factor recycling. *J Cell Sci* 118, 3387–3395.
- van der Rest, M. & Garrone, R. (1991). Collagen family of proteins. *FASEB J* 5, 2814–2823.
- Reyermier, C., Guezennec, A., Branka, J. E., Guesnet, J. & Perrier, E. (2003). In vitro stimulation of synthesis of key DEJ constituents in a reconstructed skin model: a quantitative study. *Int J Cosmet Sci* 25, 55–62.
- Rhie, G., Shin, M. H., Seo, J. Y., Choi, W. W., Cho, K. H., Kim, K. H., Park, K. C., Eun, H. C. & Chung, J. H. (2001). Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin in vivo. *J Invest Dermatol* 117, 1212–1217.
- Ricard-Blum, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3, a004978.
- Rice, R. H. & Green, H. (1979). Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions. *Cell* 18, 681–694.
- 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.
- 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.
- Rittié, L. & Fisher, G. J. (2002). UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Res Rev* 1, 705–720.
- Robert, C., Lesty, C. & Robert, A. M. (1988). Ageing of the skin: study of elastic fiber network modifications by computerized image analysis. *Gerontology* 34, 291–296.
- Robinson, D. M. & Aasi, S. Z. (2011). Cosmetic concerns and management strategies to combat aging. *Maturitas* 70, 256–260.
- Rodgers, K. D., Sasaki, T., Aszodi, A. & Jacenko, O. (2007). Reduced perlecan in mice results in chondrodysplasia resembling Schwartz-Jampel syndrome. *Hum Mol Genet* 16, 515–528.
- 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.
- Rohde, H., Bächinger, H. P. & Timpl, R. (1980). Characterization of pepsin fragments of laminin in a tumor basement membrane. Evidence for the existence of related proteins. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 361, 1651–1660.
- Roth, W., Deussing, J., Botchkarev, V. A., Pauly-Evers, M., Saftig, P., Hafner, A., Schmidt, P., Schmahl, W., Scherer, J. & other authors. (2000). Cathepsin L deficiency as molecular defect of furless: hyperproliferation of keratinocytes and perturbation of hair follicle cycling. *FASEB J* 14, 2075–2086.
- Rousselle, P., Keene, D. R., Ruggiero, F., Champlaud, M. F., Rest, M. & Burgeson, R. E. (1997). Laminin 5 binds the NC-1 domain of type VII collagen. *J Cell Biol* 138, 719–728.

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.

Rozman, J., Stojan, J., Kuhelj, R., Turk, V. & Turk, B. (1999). Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin B is a bimolecular process. *FEBS Lett* 459, 358–362.

Rünger, T. M., Quintanilla-Dieck, M. J. & Bhawan, J. (2007). Role of cathepsin K in the turnover of the dermal extracellular matrix during scar formation. *J Invest Dermatol* 127, 293–297.

Rybojad, M. (2012). [Atopic dermatitis.]. *Archives de pediatrie: organe officiel de la Societe francaise de pediatrie*.

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

§

Saftig, P., Hunziker, E., Wehmeyer, O., Jones, S., Boyde, A., Rommerskirch, W., Moritz, J. D., Schu, P. & von Figura, K. (1998). Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13453–13458.

Sage, J., Leblanc-Noblesse, E., Nizard, C., Sasaki, T., Schnebert, S., Perrier, E., Kurfurst, R., Brömme, D., Lalmanach, G. & Lecaille, F. (2012). Cleavage of Nidogen-1 by Cathepsin S Impairs Its Binding to Basement Membrane Partners. *PLoS ONE* 7, e43494.

Sakai, L. Y., Keene, D. R., Morris, N. P. & Burgeson, R. E. (1986). Type VII collagen is a major structural component of anchoring fibrils. *J Cell Biol* 103, 1577–1586.

Sakai, L. Y., Keene, D. R., Glanville, R. W. & Bächinger, H. P. (1991). Purification and partial characterization of fibrillin, a cysteine-rich structural component of connective tissue microfibrils. *J Biol Chem* 266, 14763–14770.

Sakashita, S., Engvall, E. & Ruoslahti, E. (1980). Basement membrane glycoprotein laminin binds to heparin. *FEBS Lett* 116, 243–246.

Salama, A. D., Levy, J. B., Lightstone, L. & Pusey, C. D. (2001). Goodpasture's disease. *Lancet* 358, 917–920.

Salmivirta, K., Talts, J. F., Olsson, M., Sasaki, T., Timpl, R. & Ekblom, P. (2002). Binding of mouse nidogen-2 to basement membrane components and cells and its expression in embryonic and adult tissues suggest complementary functions of the two nidogens. *Exp Cell Res* 279, 188–201.

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.

Salvesen, G. S. (2001). A lysosomal protease enters the death scene. *Journal of Clinical Investigation* 107, 21–23.

Santamaría, I., Velasco, G., Cazorla, M., Fueyo, A., Campo, E. & López-Otín, C. (1998). Cathepsin L2, a novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas. *Cancer Res* 58, 1624–1630.

- Sasaki, T., Göhring, W., Pan, T. C., Chu, M. L. & Timpl, R. (1995). Binding of mouse and human fibulin-2 to extracellular matrix ligands. *J Mol Biol* 254, 892–899.
- Sastre, J., Pallardó, F. V. & Viña, J. (2003). The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radic Biol Med* 35, 1–8.
- Scharffetter, K., Wlaschek, M., Hogg, A., Bolsen, K., Schothorst, A., Goerz, G., Krieg, T. & Plewig, G. (1991). UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo. *Arch Dermatol Res* 283, 506–511.
- Scharffetter-Kochanek, K., Brenneisen, P., Wenk, J., Herrmann, G., Ma, W., Kuhr, L., Meewes, C. & Wlaschek, M. (2000). Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Exp Gerontol* 35, 307–316.
- 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.
- Schmid-Wendtner, M.-H. & Korting, H. C. (2006). The pH of the skin surface and its impact on the barrier function. *Skin Pharmacol Physiol* 19, 296–302.
- Schönefuss, A., Wendt, W., Schattling, B., Schulten, R., Hoffmann, K., Stuecker, M., Tigges, C., Lübbert, H. & Stichel, C. (2010). Upregulation of cathepsin S in psoriatic keratinocytes. *Exp Dermatol* 19, e80–88.
- Schulze, B., Sasaki, T., Costell, M., Mann, K. & Timpl, R. (1996). Structural and cell-adhesive properties of three recombinant fragments derived from perlecan domain III. *Matrix Biol* 15, 349–357.
- Schwarz, G., Boehncke, W.-H., Braun, M., Schröter, C. J., Burster, T., Flad, T., Dressel, D., Weber, E., Schmid, H. & Kalbacher, H. (2002). Cathepsin S activity is detectable in human keratinocytes and is selectively upregulated upon stimulation with interferon-gamma. *J Invest Dermatol* 119, 44–49.
- Schymeinsky, J., Nedbal, S., Miosge, N., Pöschl, E., Rao, C., Beier, D. R., Skarnes, W. C., Timpl, R. & Bader, B. L. (2002). Gene structure and functional analysis of the mouse nidogen-2 gene: nidogen-2 is not essential for basement membrane formation in mice. *Mol Cell Biol* 22, 6820–6830.
- Seité, S., Colige, A., Piquemal-Vivenot, P., Montastier, C., Fourtanier, A., Lapière, C. & Nusgens, B. (2000). A full-UV spectrum absorbing daily use cream protects human skin against biological changes occurring in photoaging. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 16, 147–155.
- 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.
- Shankavaram, U. T., DeWitt, D. L., Funk, S. E., Sage, E. H. & Wahl, L. M. (1997). Regulation of human monocyte matrix metalloproteinases by SPARC. *J Cell Physiol* 173, 327–334.
- Shaw, E. (1990). Cysteiny proteinases and their selective inactivation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 63, 271–347.

- Sher, I., Zisman-Rozen, S., Eliahu, L., Whitelock, J. M., Maas-Szabowski, N., Yamada, Y., Breitkreutz, D., Fusenig, N. E., Arikawa-Hirasawa, E. & other authors. (2006). Targeting perlecan in human keratinocytes reveals novel roles for perlecan in epidermal formation. *J Biol Chem* 281, 5178–5187.
- 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., Sukhova, G. K., Grubb, A., Ducharme, A., Rhode, L. H., Lee, R. T., Ridker, P. M., Libby, P. & Chapman, H. A. (1999a). Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms. *J Clin Invest* 104, 1191–1197.
- Shi, G. P., Villadangos, J. A., Dranoff, G., Small, C., Gu, L., Haley, K. J., Riese, R., Ploegh, H. L. & Chapman, H. A. (1999b). Cathepsin S required for normal MHC class II peptide loading and germinal center development. *Immunity* 10, 197–206.
- Shi, G.-P., Sukhova, G. K., Kuzuya, M., Ye, Q., Du, J., Zhang, Y., Pan, J.-H., Lu, M. L., Cheng, X. W. & other authors. (2003). Deficiency of the cysteine protease cathepsin S impairs microvessel growth. *Circ Res* 92, 493–500.
- Shinkuma, S., McMillan, J. R. & Shimizu, H. (2011). Ultrastructure and molecular pathogenesis of epidermolysis bullosa. *Clin Dermatol* 29, 412–419.
- Sierra, F., Fey, G. H. & Guigoz, Y. (1989). T-kininogen gene expression is induced during aging. *Mol Cell Biol* 9, 5610–5616.
- Sires, U. I., Griffin, G. L., Broekelmann, T. J., Mecham, R. P., Murphy, G., Chung, A. E., Welgus, H. G. & Senior, R. M. (1993). Degradation of entactin by matrix metalloproteinases. Susceptibility to matrilysin and identification of cleavage sites. *J Biol Chem* 268, 2069–2074.
- Skubitz, A. P., McCarthy, J. B., Charonis, A. S. & Furcht, L. T. (1988). Localization of three distinct heparin-binding domains of laminin by monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 263, 4861–4868.
- Small, D., Burden, R. & Scott, C. (2011). The Emerging Relevance of the Cysteine Protease Cathepsin S in Disease. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* 9, 122–132.
- Smith, L. T., Holbrook, K. A. & Madri, J. A. (1986). Collagen types I, III, and V in human embryonic and fetal skin. *Am J Anat* 175, 507–521.
- Smith, M. R., Gangireddy, S. R., Narala, V. R., Hogaboam, C. M., Standiford, T. J., Christensen, P. J., Kondapi, A. K. & Reddy, R. C. (2010). Curcumin inhibits fibrosis-related effects in IPF fibroblasts and in mice following bleomycin-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 298, L616–625.
- Smola, H., Stark, H. J., Thiekötter, G., Mirancea, N., Krieg, T. & Fusenig, N. E. (1998). Dynamics of basement membrane formation by keratinocyte-fibroblast interactions in organotypic skin culture. *Exp Cell Res* 239, 399–410.
- Smyth, N., Vatansever, H. S., Murray, P., Meyer, M., Frie, C., Paulsson, M. & Edgar, D. (1999). Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J Cell Biol* 144, 151–160.

- Sok, J., Pineau, N., Dalko-Csiba, M., Breton, L. & Bernerd, F. (2008). Improvement of the dermal epidermal junction in human reconstructed skin by a new c-xylopyranoside derivative. *Eur J Dermatol* 18, 297–302.
- Srivastava, M., Steinwede, K., Kiviranta, R., Morko, J., Hoymann, H.-G., Länger, F., Buhling, F., Welte, T. & Maus, U. A. (2008). Overexpression of cathepsin K in mice decreases collagen deposition and lung resistance in response to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Respir Res* 9, 54.
- Stabuc, B., Mrevlje, Z., Markovic, J. & Stabuc-Silih, M. (2006). Expression and prognostic significance of Cathepsin L in early cutaneous malignant melanoma. *Neoplasma* 53, 259–262.
- Steinhoff, M., Neisius, U., Ikoma, A., Fartasch, M., Heyer, G., Skov, P. S., Luger, T. A. & Schmelz, M. (2003). Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin. *J Neurosci* 23, 6176–6180.
- Stern, I., Schaschke, N., Moroder, L. & Turk, D. (2004). Crystal structure of NS-134 in complex with bovine cathepsin B: a two-headed epoxysuccinyl inhibitor extends along the entire active-site cleft. *Biochem J* 381, 511–517.
- Steven, A. C. & Steinert, P. M. (1994). Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J Cell Sci* 107 (Pt 2), 693–700.
- Steven, A. C., Bisher, M. E., Roop, D. R. & Steinert, P. M. (1990). Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin--two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes. *J Struct Biol* 104, 150–162.
- Stoka, V., Turk, B., Schendel, S. L., Kim, T. H., Cirman, T., Snipas, S. J., Ellerby, L. M., Bredesen, D., Freeze, H. & other authors. (2001). Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, 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.
- Storm van's Gravesande, K., Layne, M. D., Ye, Q., Le, L., Baron, R. M., Perrella, M. A., Santambrogio, L., Silverman, E. S. & Riese, R. J. (2002). IFN regulatory factor-1 regulates IFN-gamma-dependent cathepsin S expression. *J Immunol* 168, 4488–4494.
- Stracke, J. O., Hutton, M., Stewart, M., Pendás, A. M., Smith, B., López-Otin, C., Murphy, G. & Knäuper, V. (2000). Biochemical characterization of the catalytic domain of human matrix metalloproteinase 19. Evidence for a role as a potent basement membrane degrading enzyme. *J Biol Chem* 275, 14809–14816.
- 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.
- Sugawara, K., Tsuruta, D., Ishii, M., Jones, J. C. R. & Kobayashi, H. (2008). Laminin-332 and -511 in skin. *Exp Dermatol* 17, 473–480.
- 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.
- Sumiya, S., Yoneda, T., Kitamura, K., Murata, M., Yokoo, C., Tamai, M., Yamamoto, A., Inoue, M. & Ishida, T. (1992). Molecular design of potent inhibitor specific for cathepsin B based on the tertiary structure prediction. *Chem Pharm Bull* 40, 299–303.

Summers, C. G. (2009). Albinism: classification, clinical characteristics, and recent findings. *Optom Vis Sci* 86, 659–662.

Svobodová, A., Psotová, J. & Walterová, D. (2003). Natural phenolics in the prevention of UV-induced skin damage. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 147, 137–145.



Tagami, H. (2008). Functional characteristics of the stratum corneum in photoaged skin in comparison with those found in intrinsic aging. *Arch Dermatol Res* 300 Suppl 1, S1–6.

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.

Takahashi, H., Ishidoh, K., Munro, D., Ohwada, A., Nukiwa, T., Kominami, E. & Kira, S. (1993). Cathepsin L activity is increased in alveolar macrophages and bronchoalveolar lavage fluid of smokers. *Am Rev Respir Dis* 147, 1562–1568.

Takashima, A. & Bergstresser, P. R. (1996). Impact of UVB radiation on the epidermal cytokine network. *Photochem Photobiol* 63, 397–400.

Taleb, S. & Clément, K. (2007). Emerging role of cathepsin S in obesity and its associated diseases. *Clin Chem Lab Med* 45, 328–332.

Tao, K., Stearns, N. A., Dong, J., Wu, Q. L. & Sahagian, G. G. (1994). The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch Biochem Biophys* 311, 19–27.

Terranova, V. P., Rohrbach, D. H. & Martin, G. R. (1980). Role of laminin in the attachment of PAM 212 (epithelial) cells to basement membrane collagen. *Cell* 22, 719–726.

Tersariol, I. L. S., Pimenta, D. C., Chagas, J. R. & Almeida, P. C. (2002). Proteinase activity regulation by glycosaminoglycans. *Braz J Med Biol Res* 35, 135–144.

Thomas, G. J. & Davies, M. (1989). The potential role of human kidney cortex cysteine proteinases in glomerular basement membrane degradation. *Biochim Biophys Acta* 990, 246–253.

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. & other authors. (1997). Design of potent and selective human cathepsin K inhibitors that span the active site. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 14249–14254.

Timpl, R. (1989). Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem* 180, 487–502.

Timpl, R., Rohde, H., Robey, P. G., Rennard, S. I., Foidart, J. M. & Martin, G. R. (1979a). Laminin—a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* 254, 9933–9937.

- Timpl, R., Bruckner, P. & Fietzek, P. (1979b). Characterization of pepsin fragments of basement membrane collagen obtained from a mouse tumor. *Eur J Biochem* 95, 255–263.
- Timpl, R., Wiedemann, H., van Delden, V., Furthmayr, H. & Kühn, K. (1981). A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes. *Eur J Biochem* 120, 203–211.
- Timpl, R., Dziadek, M., Fujiwara, S., Nowack, H. & Wick, G. (1983). Nidogen: a new, self-aggregating basement membrane protein. *Eur J Biochem* 137, 455–465.
- Timpl, R., Tisi, D., Talts, J. F., Andac, Z., Sasaki, T. & Hohenester, E. (2000). Structure and function of laminin LG modules. *Matrix Biol* 19, 309–317.
- Timpl, R., Sasaki, T., Kostka, G. & Chu, M.-L. (2003). Fibulins: a versatile family of extracellular matrix proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 479–489.
- Tobin, D. J., Foitzik, K., Reinheckel, T., Mecklenburg, L., Botchkarev, V. A., Peters, C. & Paus, R. (2002). The lysosomal protease cathepsin L is an important regulator of keratinocyte and melanocyte differentiation during hair follicle morphogenesis and cycling. *Am J Pathol* 160, 1807–1821.
- Tolosa, E., Li, W., Yasuda, Y., Wienhold, W., Denzin, L. K., Lautwein, A., Driessen, C., Schnorrer, P., Weber, E. & other authors. (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.
- Toomes, C., James, J., Wood, A. J., Wu, C. L., McCormick, D., Lench, N., Hewitt, C., Moynihan, L., Roberts, E. & other authors. (1999). Loss-of-function mutations in the cathepsin C gene result in periodontal disease and palmoplantar keratosis. *Nat Genet* 23, 421–424.
- 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.
- Trabandt, A., Gay, R. E., Fassbender, H. G. & Gay, S. (1991). Cathepsin B in synovial cells at the site of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 34, 1444–1451.
- Tran, K. T., Lamb, P. & Deng, J.-S. (2005). Matrikines and matricryptins: Implications for cutaneous cancers and skin repair. *J Dermatol Sci* 40, 11–20.
- Trenam, C. W., Blake, D. R. & Morris, C. J. (1992). Skin inflammation: reactive oxygen species and the role of iron. *J Invest Dermatol* 99, 675–682.
- Troen, B. R., Chauhan, S. S., Ray, D. & Gottesman, M. M. (1991). Downstream sequences mediate induction of the mouse cathepsin L promoter by phorbol esters. *Cell Growth Differ* 2, 23–31.
- Troen, B. R. (2006). The regulation of cathepsin K gene expression. *Ann N Y Acad Sci* 1068, 165–172.
- Tsen, G., Halfter, W., Kröger, S. & Cole, G. J. (1995). Agrin is a heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem* 270, 3392–3399.
- Tsukahara, K., Takema, Y., Moriwaki, S., Tsuji, N., Suzuki, Y., Fujimura, T. & Imokawa, G. (2001). Selective inhibition of skin fibroblast elastase elicits a concentration-dependent prevention of ultraviolet B-induced wrinkle formation. *J Invest Dermatol* 117, 671–677.
- Tsushima, H., Ueki, A., Matsuoka, Y., Mihara, H. & Hopsu-Havu, V. K. (1991). Characterization of a cathepsin-H-like enzyme from a human melanoma cell line. *Int J Cancer* 48, 726–732.

Tunggal, J., Wartenberg, M., Paulsson, M. & Smyth, N. (2003). Expression of the nidogen-binding site of the laminin gamma1 chain disturbs basement membrane formation and maintenance in F9 embryoid bodies. *J Cell Sci* 116, 803–812.

Turk, B., Bieth, J. G., Björk, I., Dolenc, I., Turk, D., Cimerman, N., Kos, J., Colic, A., Stoka, V. & Turk, V. (1995). Regulation of the activity of lysosomal cysteine proteinases by pH-induced inactivation and/or endogenous protein inhibitors, cystatins. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 376, 225–230.

Turk, B., Stoka, V., Turk, V., Johansson, G., Cazzulo, J. J. & Björk, I. (1996). High-molecular-weight kininogen binds two molecules of cysteine proteinases with different rate constants. *FEBS Lett* 391, 109–112.

Turk, B. (2006). Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov* 5, 785–799.

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., 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., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B. & Turk, D. (2012). Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim Biophys Acta* 1824, 68–88.

U

Uitto, J. (1989). Connective tissue biochemistry of the aging dermis. Age-associated alterations in collagen and elastin. *Clin Geriatr Med* 5, 127–147.

Uspenskaia, O., Liebetrau, M., Herms, J., Danek, A. & Hamann, G. F. (2004). Aging is associated with increased collagen type IV accumulation in the basal lamina of human cerebral microvessels. *BMC Neurosci* 5, 37.

V

Valladeau, J. (2006). [Langerhans cells]. *Med Sci (Paris)* 22, 144–148.

Varani, J., Warner, R. L., Gharaee-Kermani, M., Phan, S. H., Kang, S., Chung, J. H., Wang, Z. Q., Datta, S. C., Fisher, G. J. & Voorhees, J. J. (2000). Vitamin A antagonizes decreased cell growth and elevated collagen-degrading matrix metalloproteinases and stimulates collagen accumulation in naturally aged human skin. *J Invest Dermatol* 114, 480–486.

Varani, J., Spearman, D., Perone, P., Fligiel, S. E., Datta, S. C., Wang, Z. Q., Shao, Y., Kang, S., Fisher, G. J. & Voorhees, J. J. (2001). Inhibition of type I procollagen synthesis by damaged collagen in photoaged skin and by collagenase-degraded collagen in vitro. *Am J Pathol* 158, 931–942.

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.

Vázquez, F., Palacios, S., Alemañ, N. & Guerrero, F. (1996). Changes of the basement membrane and type IV collagen in human skin during aging. *Maturitas* 25, 209–215.

Veillard, F., Saidi, A., Burden, R. E., Scott, C. J., Gillet, L., Lecaille, F. & Lalmanach, G. (2011). Cysteine cathepsins S and L modulate anti-angiogenic activities of human endostatin. *J Biol Chem* 286, 37158–37167.

Verdier-Sévrain, S., Bonté, F. & Gilchrist, B. (2006). Biology of estrogens in skin: implications for skin aging. *Exp Dermatol* 15, 83–94.

Villone, D., Fritsch, A., Koch, M., Bruckner-Tuderman, L., Hansen, U. & Bruckner, P. (2008). Supramolecular interactions in the dermo-epidermal junction zone: anchoring fibril-collagen VII tightly binds to banded collagen fibrils. *J Biol Chem* 283, 24506–24513.

Vrhovski, B. & Weiss, A. S. (1998). Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem* 258, 1–18.

W

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.

Watkinson, A. (1999). Stratum corneum thiol protease (SCTP): a novel cysteine protease of late epidermal differentiation. *Arch Dermatol Res* 291, 260–268.

Weinstein, G. D., Nigra, T. P., Pochi, P. E., Savin, R. C., Allan, A., Benik, K., Jeffes, E., Lufrano, L. & Thorne, E. G. (1991). Topical tretinoin for treatment of photodamaged skin. A multicenter study. *Arch Dermatol* 127, 659–665.

Weiss, J. S., Ellis, C. N., Headington, J. T., Tincoff, T., Hamilton, T. A. & Voorhees, J. J. (1988). Topical tretinoin improves photoaged skin. A double-blind vehicle-controlled study. *JAMA* 259, 527–532.

Weissmann, G., Smolen, J. E. & Hoffstein, S. (1978). Polymorphonuclear leukocytes as secretory organs of inflammation. *J Invest Dermatol* 71, 95–99.

Welss, T., Sun, J., Irving, J. A., Blum, R., Smith, A. I., Whisstock, J. C., Pike, R. N., von Mikecz, A., Ruzicka, T. & other authors. (2003). Hurpin is a selective inhibitor of lysosomal cathepsin L and protects keratinocytes from ultraviolet-induced apoptosis. *Biochemistry* 42, 7381–7389.

Wex, T., Levy, B., Wex, H. & Brömme, D. (1999). Human cathepsins F and W: A new subgroup of cathepsins. *Biochem Biophys Res Commun* 259, 401–407.

Whitelock, J. M., Melrose, J. & Iozzo, R. V. (2008). Diverse cell signaling events modulated by perlecan. *Biochemistry* 47, 11174–11183.

Whitelock, J. M., Murdoch, A. D., Iozzo, R. V. & Underwood, P. A. (1996). The Degradation of Human Endothelial Cell-derived Perlecan and Release of Bound Basic Fibroblast Growth Factor by Stromelysin, Collagenase, Plasmin, and Heparanases. *J Biol Chem* 271, 10079–10086.

Wijkman, J. & Gossen, J. (2011). Inhibitors of cathepsin K: a patent review (2004 - 2010). *Expert Opin Ther Pat* 21, 1611–1629.

Willem, M., Miosge, N., Halfter, W., Smyth, N., Jannetti, I., Burghart, E., Timpl, R. & Mayer, U. (2002). Specific ablation of the nidogen-binding site in the laminin gamma1 chain interferes with kidney and lung development. *Development* 129, 2711–2722.

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.

Wolters, P. J. & Chapman, H. A. (2000). Importance of lysosomal cysteine proteases in lung disease. *Respir Res* 1, 170–177.

Woodcock-Mitchell, J., Eichner, R., Nelson, W. G. & Sun, T. T. (1982). Immunolocalization of keratin polypeptides in human epidermis using monoclonal antibodies. *J Cell Biol* 95, 580–588.

X

Xi, Y. P., Nette, E. G., King, D. W. & Rosen, M. (1982). Age-related changes in normal human basement membrane. *Mech Ageing Dev* 19, 315–324.

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.

Xu, M., Deng, B., Chow, Y.-L., Zhao, Z.-Z. & Hu, B. (2007). Effects of curcumin in treatment of experimental pulmonary fibrosis: a comparison with hydrocortisone. *J Ethnopharmacol* 112, 292–299.

Y

Yamashita, M. & Konagaya, S. (1996). A novel cysteine protease inhibitor of the egg of chum salmon, containing a cysteine-rich thyroglobulin-like motif. *J Biol Chem* 271, 1282–1284.

Yan, S., Berquin, I. M., Troen, B. R. & Sloane, B. F. (2000). Transcription of human cathepsin B is mediated by Sp1 and Ets family factors in glioma. *DNA Cell Biol* 19, 79–91.

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.

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.

Yurchenco, P. D. & Ruben, G. C. (1987). Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type IV collagen network. *J Cell Biol* 105, 2559–2568.

Yurchenco, P. D. & Schittny, J. C. (1990). Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J* 4, 1577–1590.

Yurchenco, P. D., Tsilibary, E. C., Charonis, A. S. & Furthmayr, H. (1985). Laminin polymerization in vitro. Evidence for a two-step assembly with domain specificity. *J Biol Chem* 260, 7636–7644.

Yurchenco, P. D., Cheng, Y. S. & Colognato, H. (1992). Laminin forms an independent network in basement membranes. *J Cell Biol* 117, 1119–1133.

Yurchenco, P. D., Quan, Y., Colognato, H., Mathus, T., Harrison, D., Yamada, Y. & O’Rear, J. J. (1997). The alpha chain of laminin-1 is independently secreted and drives secretion of its beta- and gamma-chain partners. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 10189–10194.

Yurchenco, P. D. & Patton, B. L. (2009). Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Curr Pharm Des* 15, 1277–1294.

Z

Zeeuwen, P. L. J. M. (2004). Epidermal differentiation: the role of proteases and their inhibitors. *Eur J Cell Biol* 83, 761–773.

Zeeuwen, P. L. J. M., van Vlijmen-Willems, I. M. J. J., Hendriks, W., Merkkx, G. F. M. & Schalkwijk, J. (2002). A null mutation in the cystatin M/E gene of ichq mice causes juvenile lethality and defects in epidermal cornification. *Hum Mol Genet* 11, 2867–2875.

Zeeuwen, P. L. J. M., Dale, B. A., de Jongh, G. J., van Vlijmen-Willems, I. M. J. J., Fleckman, P., Kimball, J. R., Stephens, K. & Schalkwijk, J. (2003). The human cystatin M/E gene (CST6): exclusion candidate gene for harlequin ichthyosis. *J Invest Dermatol* 121, 65–68.

Zeeuwen, P. L. J. M., Ishida-Yamamoto, A., van Vlijmen-Willems, I. M. J. J., Cheng, T., Bergers, M., Iizuka, H. & Schalkwijk, J. (2007). Colocalization of cystatin M/E and cathepsin V in lamellar granules and corneodesmosomes suggests a functional role in epidermal differentiation. *J Invest Dermatol* 127, 120–128.

Zeeuwen, P. L. J. M., Cheng, T. & Schalkwijk, J. (2009). The biology of cystatin M/E and its cognate target proteases. *J Invest Dermatol* 129, 1327–1338.

Zenker, M., Aigner, T., Wendler, O., Tralau, T., Müntefering, H., Fenski, R., Pitz, S., Schumacher, V., Royer-Pokora, B. & other authors. (2004). Human laminin beta2 deficiency causes congenital nephrosis with mesangial sclerosis and distinct eye abnormalities. *Hum Mol Genet* 13, 2625–2632.

Zhang, D., Huang, C., Yang, C., Liu, R. J., Wang, J., Niu, J. & Brömme, D. (2011). Antifibrotic effects of curcumin are associated with overexpression of cathepsins K and L in bleomycin treated mice and human fibroblasts. *Respir Res* 12, 154.

Zhang, J. C., Claffey, K., Sakthivel, R., Darzynkiewicz, Z., Shaw, D. E., Leal, J., Wang, Y. C., Lu, F. M. & McCrae, K. R. (2000). Two-chain high molecular weight kininogen induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis: partial activity within domain 5. *FASEB J* 14, 2589–2600.

Zheng, Y., Lai, W., Wan, M. & Maibach, H. I. (2011). Expression of cathepsins in human skin photoaging. *Skin Pharmacol Physiol* 24, 10–21.

Zouboulis, C. C. & Makrantonaki, E. (2011). Clinical aspects and molecular diagnostics of skin aging. *Clin Dermatol* 29, 3–14.

Annexes

Annexe 1

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.

Cysteine Cathepsins: Markers and Therapy Targets in Lung Disorders

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

© 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, Bühl

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- γ [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--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, Petrushova 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. Altioik 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, Filipov 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. Garner 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, Bounoux 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. Hannotiaux 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. Perdureau 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, Tomassett 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, Hurlé 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, Dumitrascu 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, Thuraiatnam 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.

Annexe 2

Cathepsin S inactivates surfactant protein A by cleavage within its carbohydrate recognition domain

F. Lecaille*, C. Naudin*, J. Sage, A. Joulin-Giet, A. Courty, R. Veldhuizen, F. Possmayer & G. Lalmanach

(*contributions égales des auteurs)

Manuscrit en préparation

Cathepsin S Inactivates Surfactant Protein A by Cleavage within its Carbohydrate Recognition Domain*

Fabien Lecaille ^{1,2,§}, Clément Naudin ^{1,2,5,§}, Juliette Sage ^{1,2,5}, Alix Joulin-Giet ^{1,2}, Agnès Courty ^{1,2}, Ruud A.W. Veldhuizen ³, Fred Possmayer ⁴ and Gilles Lalmanach ^{1,2,¶}

¹Université François Rabelais, Tours, France

²INSERM, UMR 1100 « Pathologies Pulmonaires: Protéolyse et Aérosolthérapie », Equipe « Mécanismes protéolytiques dans l'inflammation » - Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires (CEPR), Tours, France

³University of Western Ontario, Lawson Health Research Institute, Department of Medicine & Department of Physiology and Pharmacology, London, Ontario, Canada

⁴University of Western Ontario, Department of Obstetrics & Gynecology & Department of Biochemistry, London, Ontario, Canada

⁵Current addresses: C.N.: Lund University, Department of Clinical Sciences, Division of Infection Medicine, Biomedical Center (BMC), Lund, Sweden. J.S.: Université François Rabelais, INSERM, UMR 1100, Tours, France & LVMH-Recherche (Louis Vuitton-Moët Hennessy), Département Sciences du Vivant, Saint Jean de Braye, France.

[§]: Equal contribution to the work

*Running Title: *Cathepsin S inactivates SP-A by cleavage within its lectin domain*

[¶] Corresponding author: Gilles Lalmanach, PhD, INSERM, UMR 1100 « Pathologies Pulmonaires: Protéolyse et Aérosolthérapie » / CEPR, Université François Rabelais, Faculté de Médecine, 10 Boulevard Tonnellé, F - 37032 Tours cedex, France. Tel: (+33) 247366151; Fax: (+33) 247366046; e-mail: gilles.lalmanach@univ-tours.fr

Keywords : Antimicrobial Proteins; Cysteine Protease; Collectin; Cystic Fibrosis; Lung

SUMMARY

Human cysteine cathepsins (Cats) are implicated in lung injuries and tissue remodeling and have recently emerged as important players in pulmonary inflammations. The proteolytic activities of Cat B, L, K, S and H are dramatically increased in the sputum of patients with cystic fibrosis (CF), suggesting a possible involvement in the CF pathophysiology. We found that pulmonary surfactant protein A (SP-A) that participates to innate host defense is extensively degraded in CF expectorations. Degradation was impaired by E-64 and Mu-Leu-Hph-VSP_h, but not by PMSF and pepstatin A. IHC analysis showed that cathepsin S (Cat S) and SP-A co-localize in lung alveolar tissues. Cat S cleaved efficiently and specifically SP-A within critical residues of the solvent-exposed loop of its carbohydrate recognition (C-type lectin) domain that allows binding to pathogens. Cat S decreased aggregation properties of SP-A (self-aggregation, aggregation of phospholipid vesicles and rough LPS). Moreover cleavage of SP-A by Cat S reduced binding to yeast mannan and impaired agglutination of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, a foremost detrimental pathogen colonizing the lungs of CF patients. Besides neutrophil serine proteases, we propose that Cat S may participate in the pathophysiology of CF by repealing the antibacterial activity of SP-A. More broadly, present results provide further indication that lung cysteine cathepsins could display immunomodulatory functions by inactivating key proteins involved in the innate immunity response.

INTRODUCTION

Among the clinical manifestations observed in cystic fibrosis, chronic inflammation of the respiratory epithelium results primarily in the release of proteolytic enzymes in inflammatory foci. Disruption of the protease-antiprotease balance leads to the degradation of lung tissue, the impairment of antimicrobial defense mechanisms and deterioration of lung function. Identification and functional characterization of proteases involved in this deregulation, in order to target them specifically by protease inhibitors, are a therapeutic concern. Besides matrix metalloproteinases and neutrophil serine proteases (NSPs, i.e. elastase, cathepsin G, protease 3) (1), the role of lung cysteine cathepsins that are mainly produced by macrophages and epithelial cells is less documented. Human cysteine cathepsins (eleven members: cathepsins B, H, L, S, C, K, O, F, V, X and W) display potent collagenolytic and elastinolytic activities, and have emerged as new players in inflammatory lung disorders and in pulmonary homeostasis (see for review: (2, 3)). Cathepsins (Cats) participate primarily in the end-stage degradation of endocytosed proteins within lysosomes (4, 5). They are also involved in alternative cellular pathways and located in nuclei and as extracellular (soluble or cell surface-associated) molecular forms (6). They contribute to biological processes (e.g. apoptosis, angiogenesis, antigen presentation, maturation of peptide hormones) as well as a wide spectrum of illnesses (e.g. atherosclerosis, osteoporosis, adiposity, tumor invasion, pulmonary hypertension, inflammation) (7, 8). While no measurable or low Cat levels are detected in sputum (expectorations) of healthy people, their activities are dramatically increased in the sputum of cystic fibrosis (CF) patients, suggesting that Cats are involved in the pathophysiology of CF and are valuable markers of inflammation (9, 10). Both expressions of Cat B and Cat S are correlated with that of IL-8 in CF sputum (11). Also, the acid pH (below 6.0) of the epithelium lining fluid in CF provides optimal conditions for Cats activity (12). Besides chronic inflammation, hyperviscous mucus found in CF airways makes the lungs more susceptible to infection by opportunistic pathogens, including *Staphylococcus aureus* that is primarily found in the early stages of colonization and *Pseudomonas aeruginosa* that is the predominant bacterium in latter stages. In a recent work we have characterized the Cats expressed in CF expectorations (13). The cathepsins/cathepsin inhibitors imbalance remains unchanged and similar (~2-fold) in both *P. aeruginosa*-positive (*Ps*+) and *P. aeruginosa*-negative (*Ps*-) expectorations, while kininogens (family 3 of cystatins) are extensively degraded that relates to the failure of kininogens to inhibit Cat B and their subsequent cleavage by Cat B (14). The individual concentrations of

active Cats B, H, K, L and S that are the same in both *Ps*⁺ and *Ps*⁻ samples do not correlate with bacterial colonization, unlike those of human neutrophil elastase, which indicate that cysteine cathepsins are not biomarkers of infection by *P. aeruginosa* (13). Nevertheless Cats B, L and S may degrade antimicrobial peptides or proteins such as beta-defensins, lactoferrin, or secretory leucoprotease inhibitor (SLPI), and thus may contribute to the promotion of bacterial colonization and/or maintenance of infection in cystic fibrosis (9, 15, 16).

Lung epithelium assures gas-exchange in the alveoli and protects from pathogens, pollutants present within inhaled air. The function of pulmonary surfactant, which is a mixture of lipids and specific proteins, is the reduction of surface tension at the air-liquid interface, and alteration or deficiency of surfactant are primarily involved in the onset of respiratory distress syndrome found in premature neonates. Surfactant proteins are classified as hydrophobic (SP-B and SP-C) proteins that are chiefly associated with tension active properties and hydrophilic (SP-A and SP-D) proteins. Deficiency of SP-B and SP-C may result of the closure of alveoli and induce an alveolar collapse. It has been recently shown that Cat H is implicated in the maturation and secretion of SP-B (17). Likewise hydrophilic SP-A and SP-D are fundamental components of the innate immunity (18). A failure or a modification of these hydrophilic surfactant proteins has been associated to infections and exacerbation of the inflammatory response for patients suffering pneumonia, emphysema or CF, e.g. cleavage of SP-D by NSPs impairs bacterial aggregation, and binding to yeast mannan is markedly reduced. Both SP-A and SP-D that are produced by alveolar type II epithelial cells and by Clara cells are collectins: they possess a Ca²⁺-dependent C-type carbohydrate recognition domain (*e.g.* C-type lectin) and a collagen-like N-terminal domain linked by a neck region (19, 20). SP-A is a 34-kDa monomer that may form a “bouquet of tulips”-like structure (octadecamer) (21). It is well established that neutrophil elastase as well proteases from *P. aeruginosa* are involved in the breakdown and/or the inactivation of SP-A (22–24). Alternatively, beside neutrophils, it has been reported that alveolar macrophages degrade SP-A and thus could contribute to the catabolism of SP-A in the lung (25); moreover a 5- or a 23-fold greater increase in SP-A degradation was observed in response to a phorbol myristate acetate stimulation (26). Taken together with the fact that differentiated macrophages secrete and mobilize cysteine cathepsins to arm themselves with a powerful effector mechanism that can participate in the pathophysiological remodeling/degradation of target proteins (27, 28), experimental data suggest that in addition to bacterial proteases and host NSPs, complementary proteases may be involved. Based on these observations, the aim of the study was to determine if human cysteine cathepsins that have emerged as new players

in inflammatory lung disorders and are possibly involved in the pathophysiology of CF (2) could likely participate in the degradation of SP-A that is upset in both (*Ps*+) and (*Ps*-) expectorations of CF patients. IHC analysis showed that Cat S and SP-A co-localized in the lung alveolar epithelium. Among Cats tested (B, C, H, K, L and S), Cat S contributes specifically and efficiently to SP-A hydrolysis by cleaving within the functional carbohydrate recognition domain. Such hydrolysis spoils mannan binding, phospholipids aggregation and bacterial agglutination properties of SP-A. Therefore present data underpin that Cat S may be a potent modulator of innate immunity response via its proficiency to impair anti-microbicidal properties of SP-A.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Enzymes, synthetic substrates and inhibitors

Human Cats B, L, H and S came from Calbiochem (VWR International S.A.S, Libourne, France). Human Cat K was kindly provided by Prof. D. Brömme (University of British Columbia, Department of Oral Biological and Medical Sciences, Vancouver, Canada). Bovine Cat C, pepstatin A, methylmethanethiosulfonate (MMTS), L-3-carboxy-trans-2, 3-epoxy-propionyl-leucylamide-(4-guanido)-butane (E-64), phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). N-(L-3-trans-propylcarbamyloxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline (CA-074) was from Calbiochem. Morpholine urea-leucyl-homophenylalanyl-(vinylsulfonyl)benzene (Mu-Leu-Hph-VSPH) was kindly provided by Prof. J.H. McKerrow (Department of Pathology, The Sandler Center for Basic Research in Parasitic Diseases, University of California, San Francisco, CA, USA). DL-dithiothreitol (DTT), benzyloxycarbonyl-Arg-Arg-7-amino-4-methyl coumarin (Z-Arg-Arg-AMC), 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). Enzymes were titrated by E-64. All other reagents were of analytical grade.

Biological samples

Twenty-five sputum samples (nineteen *P. aeruginosa*-positive samples and six *P. aeruginosa*-negative specimens) from CF adult patients were kindly provided by Dr G. Couetdic and Prof. P. Plésiat (Laboratoire de Bactériologie, CHU Jean Minjoz, Besançon, France) as previously detailed (13). Specimens were handled, centrifuged at 5000 g at 4°C for 10 min before supernatants were frozen and stored at -80°C until use. Human surfactant protein A was isolated from whole lung lavage obtained from an alveolar proteinosis patient using butanol extraction as previously described (29). Finally, the purified SP-A was concentrated to 3 mg/ml before storage at -20°C. Rabbit polyclonal antibody is a kind gift from Dr Henk Haagsman (Department of Immunology and Infectious Diseases, Utrecht University, Netherlands). Protein concentration was determined using the bicinchoninic acid (BCA) assay (Protein Assay Kit, Interchim, Montluçon, France) and alternatively the Bradford protein assay (Bio-Rad France, Marnes-la-Coquette). Prof. Agnes Rosenau (EA 3854 Bactéries et Risque Materno-foetal, Université F. Rabelais, Tours, France) provided us with *P. aeruginosa*

strain (ATCC number: 27853). *Escherichia coli* (J5 strain; ATCC number: 43745) came from LGC Standards (Molsheim, France).

IHC analysis of lung cathepsin S and SP-A

Anti-cytokeratin 7 (a cytoplasm marker that is confined to glandular and transitional epithelial cells) and anti- thyroid transcription factor 1 (a nucleus marker, which located primarily in the nucleus of type II pneumocytes and Clara cells) were used as control (Dako France SAS, Trappes, France). The monoclonal mouse anti-human SP-A antibody and the polyclonal goat anti-human Cat S antibody came from Abcam France (Paris, France). Lung tissue samples were obtained from patients who had undergone lung resection without preoperative samples were selected from each fresh surgical specimen, immediately formalin-fixed and paraffin-embedded (Department of Histopathology, The University Hospital Center Trousseau, Tours, France). The tissue specimens were banked with informed consent in compliance with the Helsinki Accord and French bioethical regulations. Serial sections (3.5 microns) of alveolar lung tissue were fixed with paraformaldehyde, then paraffin. The formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections were further mounted on glass slides (adhesive plates SuperFrost Plus, VWR). Prior to immunohistochemical staining, the paraffin wax was removed by xylene. Tissue sections were rehydrated by sequential washings with ethanol and with water, then immersed in the Dako Target Retrieval solution. Slides were heated then cooled according to the manufacturer, and washed with water then PBS containing 0.2% Tween. Endogenous peroxidase activities were neutralized by addition of hydrogen peroxide 3% for 10 min. After washing (PBS containing 0.2% Tween) tissue sections were incubated with primary antibodies (diluted in the Real Dako Antibody Diluent) for 1 h at room temperature. The EnVision/Dual Link System-HRP (Dako) was applied for 30 minutes for the mouse anti-human SP-A antibody, while a biotinylated anti-goat antibody (Dako) was used for anti-Cat S. Staining was performed by the high-sensitivity substrate-chromogen system, Dako Liquid DAB (3, 3-diaminobenzidine tetrahydrachloride), forming a brown end product upon oxidation. Hematoxylin was applied then the sample was dehydrated with alcohol. Finally tissue sections were observed (Nikon E600 optical microscope, magnification: 20-1000). Images were captured (Olympus DP70 camera) and processed with the Olympus DP Controller software. IHC Staining controls were performed under same conditions.

Immunodetection of SP-A in CF sputum

Supernatants of CF sputum (30 µg protein) corresponding to both (Ps+) and (Ps-) specimens 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, Bio-Rad) and electroblotted onto nitrocellulose membranes (Hybond-ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). These membranes were incubated overnight at 4°C with a rabbit polyclonal anti-SP-A antibody (1:2500 in PBS, 0.1% Tween 20, 5% powdered milk), then with the secondary IgG-horseradish 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). Purified SP-A (150 ng) was treated under the same conditions as control.

Hydrolysis of exogenous SP-A in CF sputum

Exogenous purified SP-A (150 ng) was incubated at 37°C with (Ps+) and (Ps-) supernatants in 0.1M sodium acetate buffer, pH 5.5, 0.01% Brij35 and 4 mM DTT (0-8 h) in the presence or not of 0.5 mM PMSF and 40 µM pepstatin A (final volume: 16 µl; 30 µg protein). Subsequent control experiments were achieved: i.e. absence of exogenous SP-A, or pre-incubation either with 10 µM Mu-Leu-Hph-VSPH or 10 µM E-64. Alternatively the same protocol was performed in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4 (0-4 h). Samples were subjected to electrophoresis SDS-PAGE (15%) under reducing conditions, then subjected to WB analysis as described above using an anti-SP-A antibody.

Degradation of SP-A by Cats

Purified SP-A (3 µg) was incubated with increasing concentrations of purified CPs, B, C, H, K, L and S (0-200 nM), in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5, 2 mM DTT, 0.01% Brij35 for 10 min at 37°C, subjected to electrophoresis (15% SDS-PAGE) under reduced conditions and the degradation products were visualized by Coomassie staining. Alternatively the same protocol was performed in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, 2 mM DTT, 0.01% Brij35. In control experiments Cats were pre-incubated in presence of E-64 (10 µM) before adding SP-A. In a second step, Cat S cleavage sites were identified by N-terminal sequencing as described before (30). Briefly, SP-A (3 µg) was incubated with Cat S (10 nM) in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5, 2 mM DTT, 0.01% Brij35 for 10 min at 37°C, subjected to electrophoresis (15% SDS-PAGE) under reducing conditions for 1 h, transferred onto polyvinylidene fluoride membrane (Prosorb inserts, Applied Biosystems, France) then

handled as recommended by the supplier. Coomassie Brilliant Blue R250-stained strips were excised and analyzed by the Edman method (Procise 491 automated aminoacid sequencer, Applied Biosystems).

Kinetics measurement

All Fmoc-protected amino acids were of the L-configuration, and were purchased from NeoMPS (Strasbourg, France), and Advanced Chemtech (Cambridge, GB). The intramolecularly quenched fluorogenic substrate, Abz-NWYRGEPA-(3-NO₂-Tyr) that corresponds to residues Asn190 to Ala197 within the CRD domain of SP-A, flanked by a N-terminal fluorescence donor group (Abz) and a C-terminal quencher group (3-NO₂-Tyr), was prepared by standard Fmoc solid phase peptide synthesis (31). Kinetics assays (triplicate) were carried out at 37°C by adding enzymes (1-10 nM) to the fluorogenic substrate (0.5 μM) in their activity buffer (Cary Eclipse spectrofluorimeter, Varian SA, Les Ulis, France; excitation wavelength: 320 nm, emission wavelength: 420 nm). Second-order rate constants (k_{cat}/K_m) for the hydrolysis of Abz-NWYRGEPA-(3-NO₂-Tyr) was determined under pseudo-first order conditions as described elsewhere (values reported as means ± S.D) using the Enzfitter software (Biosoft, Cambridge, UK) (32).

Molecular modeling of human SP-A

Rat SP-A (PDB 1R14) that served as a template protein and human SP-A (accession number Q8IWL2, Protein Knowledgebase, UniProtKB) were aligned by using the multiple sequence alignment program CLUSTAL W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Predicting the 3D structure of human SP-A was performed with the method of comparative modeling according to the spatial constraints using the server-3D JIGSAW (www.bmm.icnet.uk/~3djigsaw).

Binding of the CRD domain to mannan

SP-A (3 μg) was incubated with Cat S (100 nM) in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5, 2 mM DTT, 0.01% Brij35 for 1 h at 37°C. Control experiments were conducted with E-64-inactivated Cat S or in the absence of Cat S. Otherwise samples were incubated in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM DTT, 0.01% Brij35. Samples were further added into wells (96-well plate, Nunc Maxisorp Immunoplate, Nunc A/S, Roskilde, Denmark) previously coated by mannan from *Saccharomyces cerevisiae* (100 ng / well, Sigma-Aldrich) 2 h at room temperature (RT). After incubation with the polyclonal anti-SP-A antibody (dilution 1:2000 in

PBS, 0.1% Tween 20, 5% powdered milk) for 2 h (RT), then with the secondary IgG-HRP conjugate (dilution 1:10000) for 1 h (RT). Binding of SP-A to mannan was revealed at RT by measurement of peroxidase activity using the chromogenic 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) system (Vector Laboratories, CA, USA) at 450 nm. Results were normalized and relative absorbance, and median (+/- extreme) values reported. Significance ($p < 0.05$) was determined using the non-parametric statistical Friedman test.

Aggregation properties of SP-A

Rc-LPS (*E. coli*, J5 strain), 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC) and 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (DPPG) came from Sigma-Aldrich. DPPC and DPPG (7:3, m/m) were combined and dissolved in a solution of chloroform-methanol (1:1, v/v). After evaporation under nitrogen at 20°C, the mixture of DPPC/DPPG was rehydrated in 25 mM HEPES buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, for 1 h at 50°C (transition temperature), then lipid vesicles were produced by carrying out 10 rounds (30 sec each) of sonication (Sonics VibraCell Ultrasonic Processor Model VC70T, Sonics & Materials, Newton, USA). The same procedure was used for Rc-LPS (1.5 mg/ml).

(a) *Self-aggregation of SP-A.* SP-A (3 µg) was incubated with Cat S (100 nM) in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5, 4 mM GSH, 0.01% Brij35 (buffer A), for 1 h at 37°C (final volume 20 µl), before adding E-64 (5 µM). Control was made in the presence of E-64-treated Cat S. Samples were further mixed with 25 mM HEPES buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 8 mM GSSG (buffer B) at 37°C (final volume in the cuvette: 600 µl). Ca^{2+} (2.5 mM) was added after 10 min then EDTA (5 mM) after 40 min. Self-aggregation was monitored at 360 nm (spectrophotometer Varian Cary 100 Scan, Varian Medical Systems France, Buc) and analyzed using the software CARY WinUV kinetics.

(b) *Aggregation of lipid vesicles.* SP-A (5 µg) was incubated with Cat S (100 nM) in buffer A for 2 h at 37 ° C (final volume 20 µl), then E-64 (5 µM) was added. Control was made in the presence of E-64-treated Cat S. DPPC/DPPG (60 µg/ml) was further added to buffer B (final volume: 600 µl) at 37°C before successive addition of Ca^{2+} (2.5 mM) then EDTA (5 mM), while aggregation of DPPC/DPPG vesicles was monitored at 400 nm as described above. A similar protocol was used for studying aggregation of Rc-LPS vesicles (40 µg/ml), except that SP-A (12 µg) was incubated with Cat S for 4 h. Competition experiments were performed in the presence of SP-A and mannan (10 mg/ml).

Agglutination properties of bacteria

P. aeruginosa was grown on Columbia agar (Fluka, St. Quentin Fallavier, France). After an overnight culture, bacteria were diluted 1:10 and cultured in a TSB medium (Tryptic soy broth, Fluka) for 3 h at 37°C under stirring to reach the exponential phase. Bacteria were recovered by centrifugation (2000 g, 10 min), washed 3 times and resuspended in PBS. The concentration was determined by measuring absorbance ($Abs_{595\text{ nm}} = 0.1$ corresponding to 8.10^7 bacteria/ml). Alternatively *E. coli* J5 strain was grown on LB agar Lennox agar (Fluka). After an overnight culture, bacteria were diluted 1:25 and cultured in LB medium Broth (Fluka) for 3 h at 37°C under stirring to get the exponential phase. Following centrifugation (2000 g, 10 min), 3-times washing and resuspended in PBS at $7.5.10^9$ bacteria/ml.

(a) *E. coli* agglutination. After incubation with Cat S (100 nM) in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5, 2 mM DTT, 0.01% Brij35 for 1 h at 37 ° C, SP-A (6 µg) was added to 25 mM HEPES buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM calcium in the presence of a fresh bacterial preparation in a quartz cuvette (2.5×10^8 bacteria/ml) (final volume: 600 µl). The bacterial agglutination was monitored by measuring the absorbance at 700 nm for 2 h at 20°C (Hitachi U-1500 spectrophotometer, Hitachi, Tokyo, Japan). Control experiments were conducted in the absence of *E. coli*, Cat S or E-64-inactivated Cat S. Separately agglutination tests were completed in tube with SP-A (30 µg), and identical concentrations of Cat S and bacteria (2.5×10^8 bacteria/ml; volume: 3 ml).

(b) *P. aeruginosa* agglutination. SP-A (3 µg) was incubated as described above. Alternatively, incubation was conducted in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM DTT, 0.01% Brij35 for 2 h, before addition to a fresh preparation of *P. aeruginosa* (3.10^7 bacteria/ml; final volume: 200 µl) using flat-bottom 96 well plates (Nunc A/S). The bacterial agglutination was determined by measuring absorbance at 570 nm for 3 h at 20°C (ThermoMax microplate spectrophotometer, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) and analyzed with SoftMax Pro software. Control experiments were conducted in the lack of *P. aeruginosa*, Ca^{2+} , Cat S and inactivated Cat S, respectively. Independently agglutination tests were completed in tube with SP-A (30 µg) and identical concentrations of Cat S and bacteria (3.10^7 bacteria/ml; volume: 3 ml). In a parallel set of experimentations, agglutination reactions were stained with 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) dihydrochloride (Sigma-Aldrich) and visualized by fluorescence microscopy (Olympus Fluoview 500 instrument, magnification, 40 x).

RESULTS

SP-A is degraded in CF sputum

Both the ~65 kDa dimeric form and the ~34 kDa monomeric form that correspond to intact SP-A were not immunodetected in sputum supernatants (Figure 1A: see representative samples). This observation correlates with the SP-A deficiency stated for CF patients (33, 34). However a major proteolytic fragment (circa 45 kDa) was observed in both (Ps+) and (Ps-) CF samples. A similar SP-A fragment was generated under *in vitro* conditions by *P. aeruginosa* protease IV or serine proteases of human neutrophils, and their involvement in the degradation of SP-A in CF patients has been reported (22, 35). Nevertheless other proteases may also be implicated in such proteolytic process. Indeed, the presence of a 45 kDa SP-A fragment in patients not infected with *P. aeruginosa* was already documented (23), and *Dermatophagoides allergens* Der p1 and Der f1, which have a thiol-dependent activity, are also able to degrade SP-A (36). Taken together these data and that the proteolytic activities of human cysteine cathepsins in CF sputum do not depend on the infection status by *P. aeruginosa* (13), their ability to participate in the alteration of SP-A was further explored. Exogenous SP-A added to (Ps-) CF sputum was entirely degraded after 8 h despite the presence of PMSF and pepstatin A (incubation at pH 5.5). Degradation was impaired by E-64, the broad-spectrum cathepsin inhibitor and Mu-Leu-Hph-VSPh, a Cat S inhibitor (Figure 1B). Analogous results were observed for (Ps+) CF samples. Purified SP-A was also readily hydrolyzed in less than 4 h at pH 7.4. Again both E-64 and Mu-Leu-Hph-VSPh showed a similar pattern of inhibition, supporting that Cat S, which displays a unique stability at a mild basic pH, might be the main thiol-dependent enzyme involved in SP-A degradation (Figure 1C). Conversely, it is noteworthy that uncleaved SP-A was found in sputum of patients with scleroderma, and addition of exogenous Cat S led to the rapid hydrolysis of both dimeric and monomeric forms of SP-A (data not shown).

Co-localization of SP-A and Cat S in lung tissue

We analyzed the tissue distribution of Cat S and SP-A antigens by immunohistochemistry in distal bronchial and bronchiolar/alveolar junction epithelial cells of formalin-fixed paraffin-embedded normal human lung tissue. Lung tissue showed strong SP-A and Cat S staining along the alveolar septa and also of large mononuclear cells and dust cells scattered on alveoli or their walls (37–40). Both type I and II pneumocytes were stained for Cat S and SP-A that is consistent with the known localization of SP-A production (Figure 2). Albeit serial sections,

our data strongly suggest that both Cat S and SP-A are co-expressed by the same alveolar macrophages and type I and II alveolar cells. On the opposite, a negative or very faint IHC expression of Cat S and SP-A was detected in red blood cells, smooth muscle, vascular and conjunctive tissues. Lastly, strongly immuno-reactive Cat S was found in sero-mucous glands, basal, columnar ciliated and non-ciliated cells of small distal bronchi branch and bronchioles, while non-ciliated Clara cells of the bronchiolar epithelium displayed a weaker staining for SP-A (data not shown).

Cat S cleaves SP-A within its functional lectin-like domain

SP-A was incubated under *in vitro* conditions with individual Cats. Only Cat S hydrolyzed efficiently SP-A, compared to Cats L and K while Cats H, C and B did not (Figure 3A). Furthermore the concentration-dependent degradation of SP-A by Cat S was more efficient at pH 7.4 (Figures 3B & 3C) in accordance with former assays made using CF supernatants. N-terminal sequencing identified three cleavage sites, all of them with a glycine residue at P'1. The main site corresponds to the Arg193-Gly194 bond, while the two secondary sites are Val114-Gly115 and Arg199-Gly200. Interestingly, Val114-Gly115 is located at the N-terminus of the carbohydrate recognition domain (CRD), in the vicinity of the neck region linking the lectin-like domain and the collagen-like domain (Figure 4). Both the main Arg193-Gly194 and the secondary Arg199-Gly200 cleavage sites are located close to critical residues of CRD that forms a large solvent-exposed loop (Ser181-Gln203) at the surface of the molecule (41). Two residues, Glu195 and Glu202, together with residues Asn214 and Asp215 are involved in a coordination bond with a calcium ion (42). Moreover mutagenesis studies have shown that Glu202 and Arg197 are also essential for the binding of phospholipids and carbohydrates to rat recombinant SP-A (43, 44). Treatment of SP-A by Cat S at pH 5.5 and pH 7.4 decreased binding to microplate-coated mannan by approx. 50% and approx. 70%, respectively (Figure 5). Conversely oligosaccharide binding is restored in the presence of E-64, supporting that Cat S may proteolytically impair sugar recognition, thus leading to the functional inactivation of SP-A under *in vitro* conditions. We designed a peptidyl substrate with fluorescence resonance energy transfer properties, Abz-NWYRGEP(3-NO₂-Tyr) and corresponding to residues Asn190-Ala197 that flank either side of the major cleavage site (i.e. Arg193-Gly194) within CRD. At pH 5.5 second-order rate constants (k_{cat}/K_m) values were 2.42 $\pm$ 0.4 mM⁻¹.s⁻¹ for Cat K, 58.5 $\pm$ 9 mM⁻¹.s⁻¹ for Cat L and 764 $\pm$ 15 mM⁻¹.s⁻¹ for Cat S. Cat S but not Cats L and K still powerfully cleaved Abz-NWYRGEP(3-NO₂-Tyr) at a mild basic pH (k_{cat}/K_m = 300 $\pm$ 3.5 mM⁻¹.s⁻¹; pH 7.4) between Arg193 and

Gly194. Conversely human neutrophil serine proteases, i.e. elastase ($k_{\text{cat}}/K_m = 1.96 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) and cathepsin G ($k_{\text{cat}}/K_m < 1 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) cleaved very weakly the CRD-derived peptide, while aspartic cathepsin D did not hydrolyze Abz-NWYRGEPa-(3-NO₂-Tyr). Enzymatic assays confirmed that cleavage within exposed residues of the loop at the surface of the lectin-like moiety is highly specific for Cat S. Thus one might ask if Cat S-dependent hydrolysis of CRD may modulate biological properties of SP-A as observed for the other related surfactant collectin, SP-D that lost its ability to agglutinate *P. aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* following proteolytic inactivation by neutrophil serine proteases (45, 46).

Cat S impairs CRD-dependent aggregation properties of SP-A

SP-A has the proficiency/ability to self-aggregate and binds to DPPC-containing phospholipid vesicles (47, 48) that mainly involved CRD residues Tyr161, Tyr164, Tyr192, Tyr208 and also Glu202. We therefore examined the consequences of the proteolytic degradation of SP-A by Cat S on its capacity for Ca²⁺-dependent self-aggregation and aggregation of vesicles of DPPC/DPPG (49), as well aggregation of rough LPS (Rc-LPS), the major membrane component of Gram-negative bacteria and a potent ligand of SP-A (50). After incubation with Cat S, SP-A lacked significantly its ability to self-aggregate but also to aggregate phospholipid vesicles (Figure 6A & B). Similarly, cleavage of SP-A, thought to interact with the lipid A moiety (50) impaired aggregation of Rc-LPS vesicles. An equivalent effect was observed in the presence of mannan competing with Rc-LPS (Figure 6C). A background absorbance signal that corresponds to Ca²⁺-dependent self-aggregation of LPS (51) was measured. Aggregation properties of SP-A towards phospholipids and LPS were restored in the presence of chemically- or heat-inactivated Cat S, substantiating that impairment specifically depends on the proteolytic activity of the enzyme, and the ensuing CRD cleavage. It has to be noticed that the main cleavage site of Cat S within the Arg193-Gly194 bond is located in the direct vicinity of Tyr192 that is critical for aggregation. In a previous study, it has been proposed that both CRD-dependent self-aggregation of SP-A, aggregation of phospholipids and aggregation of LPS via lipid A depend on the structural integrity of SP-A organized as a supra-trimeric molecule (51).

Cat S prevents bacterial agglutination properties of SP-A

Protein-carbohydrate interactions serve multiple functions in the immune system. Particularly pulmonary surfactant proteins mediate pathogen recognition using their Ca²⁺-dependent

C-type carbohydrate recognition domains by binding of terminal monosaccharide residues characteristic of bacterial cell surfaces. The broad selectivity of the monosaccharide-binding site depends on the structural integrity and the geometrical arrangement of CRD (52). Also we examined the ability of SP-A to agglutinate the Gram-negative *Escherichia coli* (J5 strain) in order to evaluate the impact of degradation of SP-A by Cat S on its antibacterial properties. Indeed intact SP-A agglutinated *E. coli* as evidenced by the decrease in absorbance due to the precipitation of bacteria; conversely presence of Cat S reduced prominently *E. coli* agglutination as observed directly in the test tubes (Figure 7). Addition of E-64 restored bacterial agglutination, confirming that the lack of binding properties depends on the proteolytic cleavage within the CRD loop. Both E-64 and Cat S used as control and incubated with bacteria in the lack of SP-A do not affect *E. coli* agglutination (data not shown). Then we performed complementary agglutination assays on *P. aeruginosa*, a foremost pathogen colonizing the lungs of CF patients and that is often the ultimate cause of death in many people with CF (53). Remarkably transgenic SP-A (-/-) mice demonstrate increased bacterial proliferation, more intense lung inflammation, and a defective clearance of *P. aeruginosa* (54). As observed with *E. coli*, whereas intact SP-A agglutinated *P. aeruginosa*, there was no agglutination following incubation of SP-A with Cat S (Figure 8A). In a parallel experiment, the reactions were visualized by optical microscopy and stained for fluorescence microscopy (DAPI dying) (Figure 8B). Untreated SP-A aggregated bacteria as demonstrated by formation of clumps (lane 3), while addition of Cat S results in the loss of the ability of SP-A to agglutinate *P. aeruginosa*, which confirms that cleavage of the Arg193-Gly194 bond within the exposed loop of CRD interferes with the C-type lectin activity of SP-A.

DISCUSSION

Surfactant protein A, a multimeric collagenous lectin, is an important host defense component of the lung. The finding that SP-A deficient mice displayed severe lung inflammation and a shortfall of clearance of *P. aeruginosa* has emphasized the crucial role of SP-A in immunity (54). SP-A mediates the clearance of pathogens and modulates immune cell functions via its C-terminal carbohydrate recognition domains. Previous studies have shown that the injury of SP-A is associated with several lung diseases including cystic fibrosis (55). Nevertheless a limitation is that there is no satisfactory mouse model that mimics accurately human CF (for review: (56)). As SP-A participates in host bacterial defense, this functional deficiency due to both proteolytic damages and oxidative modifications (nitration and hydroxylation) may

predispose to lung infection in CF patients (57). Analysis of CF bronchoalveolar fluids showed a decreased content of intact SP-A associated to the loss of its lectin properties, i.e., loss of binding to sugar moieties and ability to agglutinate bacteria (45). Related surfactant protein D (SP-D) also plays crucial protective roles against bacteria, fungi, and respiratory viruses. Human NSPs (elastase, proteinase 3, and cathepsin G) specifically degraded SP-D in a time- and dose-dependent manner, and generated proteolytic ~35 kDa fragments (46). On the other hand human neutrophil elastase, a reliable marker of inflammation, also cleaves SP-A (22, 58). Also alveolar macrophages degrade SP-A and thus could contribute to its turnover in the lung (25); a critical increase in SP-A proteolysis was observed in response to phorbol myristate acetate stimulation (26). Taking into account that differentiated macrophages express large amounts of active Cats that participate in the remodeling/degradation of target proteins (27, 28), experimental data suggest that other proteases mainly from macrophages may participate in SP-A degradation besides host neutrophil serine proteases and proteases from pathogens. Such statements and a growing body of evidence of the worthy role that Cats may play in innate immunity by abrogating the microbicidal activity of defensins, lactoferrin, and secretory leukocyte protease inhibitor (see pioneering works: (9, 15, 16, 59)) prompted us to investigate if these enzymes could participate in SP-A degradation and consequently modulate its antibacterial properties. Indeed hydrolytic activities of Cats are dramatically increased in sputum of CF patients and may contribute to the pathophysiology of CF by favoring infection and the colonization by pathogens like *P. aeruginosa* (11, 13). IHC analysis performed on human lung tissue samples demonstrated an intense staining of both SP-A and Cat S antigens along epithelial cells and especially type II pneumocytes of lung alveoli, which is consistent with the known sites of SP-A production (60). In overall, these data support that Cat S and SP-A have a matching tissue distribution in distal bronchial and bronchiolar/alveolar epithelia and consequently that Cat S may encounter SP-A. We did not detect undamaged SP-A in both (*Ps*+) and (*Ps*-) CF sputa, but identified a major proteolytic fragment. The time- and dose-dependent degradation of exogenous SP-A added to CF sputum was markedly reduced by Mu-Leu-Hph-VSP_h, a Cat S irreversible inhibitor, at both acid and mildly basic pH. We identified a main cleavage site (Arg193-Gly194 bond) located within the solvent-exposed loop of the CRD domain. The significance of these findings correlated with analysis of CF expectorations in which we have previously identified free active Cats (13). In addition, the major SP-A cleavage product by Cat S is similar to that generated by Cat S under *in vitro* conditions and may have deleterious effects on its biological functions. Indeed Cat S-dependent cleavage significantly decreased the ability of SP-A to bind to yeast mannan

indicating that Cat S may impair sugar-binding properties of the C-type lectin domain, similarly to that observed for SP-D in the presence of neutrophil elastase (22). Furthermore Cat S abrogates Ca^{2+} -dependent self-aggregation of SP-A, aggregation of LPS vesicles as well binding to phospholipids (DPPC, the major lipid of surfactant, ~85%; and DPPG, the second component of surfactant, ~11%), which is also critical for tensioactive properties of surfactant (60). Four hydrophobic tyrosyl residues were identified as essential for lipid aggregation, including Tyr192 within the Ser181-Gln203 loop and 1-residue upstream of the primary attack site (Arg193-Gly194 bond) for Cat S. Once cleaved by Cat S structural modifications/rearrangements of SP-A, and especially in the functional lectin-like (CRD) domain, might occur. Accordingly, in a previous study, it has been proposed that biological properties of SP-A, including interactions with surfactant lipids and microbial cell wall glycoconjugates, depend on the structural integrity of SP-A organized as a supra-trimeric molecule (51). Moreover as a complementary consequence of the proteolytic cleavage of the CRD, Cat S abrogated agglutination of *E. coli* and development of clumps for *P. aeruginosa*. According to *P. aeruginosa* is the pathogen most often responsible for the deaths of CF patients, present data are of major importance (61). In addition to well-defined biological functions of Cat S (62), our results suggest a novel role as a deleterious host protease when cathepsins/cathepsin inhibitors balance is in favor of uncontrolled proteolysis as demonstrated for cystic fibrosis (2, 13). Conversely to Cat H that is involved in the processing and secretion of SP-B and thus exerts beneficial effects on pulmonary surfactant homeostasis (17), Cat S may harmfully contribute to the degradation of hydrophilic SP-A and consequently favoring infections by pathogens such as *P. aeruginosa*. Taken together with recent evidences that lung Cats B and L proteolytically inactivate antimicrobial peptides and proteins such as lactoferrin and beta-defensins, we could hypothesize that, besides NSPs that abrogate antimicrobial activity of SP-D, Cat S may therefore be a new and biologically relevant partner in the pathophysiology of CF by abrogating CRD-dependent microbicidal activity of SP-A. More broadly, present results provide further indication that cysteine cathepsins could finely tune the raise of bacterial infections during lung disorders by inactivating key proteins involved in the innate immunity response.

REFERENCES

1. Korkmaz, B., Horwitz, M. S., Jenne, D. E., and Gauthier, F. (2010) Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. *Pharmacol. Rev* **62**, 726–759
2. Kasabova, M., Saidi, A., Naudin, C., Sage, J., Lecaille, F., and Lalmanach, G. (2011) Cysteine Cathepsins: Markers and Therapy Targets in Lung Disorders. *Clin. Rev. Bone Miner. Metab.* **9**, 148–161
3. Wolters, P. J., and Chapman, H. A. (2000) Importance of lysosomal cysteine proteases in lung disease. *Respir. Res.* **1**, 170–177
4. Turk, V., Stoka, V., Vasiljeva, O., Renko, M., Sun, T., Turk, B., and Turk, D. (2012) Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochim. Biophys. Acta* **1824**, 68–88
5. Turk, B., Turk, D. S. A., and Turk, V. (2012) Protease signalling: the cutting edge. *EMBO J.* **31**, 1630–1643
6. Brix, K., Dunkhorst, A., Mayer, K., and Jordans, S. (2008) Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie* **90**, 194–207
7. Lecaille, F., Kaleta, J., and Brömme, 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
8. Reiser, J., Adair, B., and Reinheckel, T. (2010) Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J. Clin. Invest.* **120**, 3421–3431
9. Taggart, C. C., Greene, C. M., Smith, S. G., Levine, R. L., McCray, P. B., Jr, O'Neill, S., and McElvaney, N. G. (2003) Inactivation of human beta-defensins 2 and 3 by elastolytic cathepsins. *J. Immunol.* **171**, 931–937
10. Voynow, J. A., Fischer, B. M., and Zheng, S. (2008) Proteases and cystic fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 1238–1245
11. Martin, S. L., Moffitt, K. L., McDowell, A., Greenan, C., Bright-Thomas, R. J., Jones, A. M., Webb, A. K., and Elborn, J. S. (2010) Association of airway cathepsin B and S with inflammation in cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol* **45**, 860–868
12. Tate, S., MacGregor, G., Davis, M., Innes, J. A., and Greening, A. P. (2002) Airways in cystic fibrosis are acidified: detection by exhaled breath condensate. *Thorax* **57**, 926–929
13. Naudin, C., Joulin-Giet, A., Couetdic, G., Plésiat, P., Szymanska, A., Gorna, E., Gauthier, F., Kasprzykowski, F., Lecaille, F., and Lalmanach, G. (2011) Human

Cysteine Cathepsins Are Not Reliable Markers of Infection by *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. *PLoS ONE* **6**, e25577

14. Naudin, C., Lecaille, F., Chowdhury, S., Krupa, J. C., Purisima, E., Mort, J. S., and Lalmanach, G. (2010) The occluding loop of cathepsin B prevents its effective inhibition by human kininogens. *J. Mol. Biol.* **400**, 1022–1035
15. Taggart, C. C., Lowe, G. J., Greene, C. M., Mulgrew, A. T., O'Neill, S. J., Levine, R. L., and McElvaney, N. G. (2001) Cathepsin B, L, and S cleave and inactivate secretory leucoprotease inhibitor. *J. Biol. Chem.* **276**, 33345–33352
16. Rogan, M. P., Taggart, C. C., Greene, C. M., Murphy, P. G., O'Neill, S. J., and 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
17. Bühling, F., Kouadio, M., Chwieralski, C. E., Kern, U., Hohlfeld, J. M., Klemm, N., Friedrichs, N., Roth, W., Deussing, J. M., Peters, C., and Reinheckel, T. (2011) Gene targeting of the cysteine peptidase cathepsin H impairs lung surfactant in mice. *PLoS ONE* **6**, e26247
18. Crouch, E., and Wright, J. R. (2001) Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense. *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 521–554
19. Gupta, G., and Surolia, A. (2007) Collectins: sentinels of innate immunity. *Bioessays* **29**, 452–464
20. Haagsman, H. P., Hogenkamp, A., van Eijk, M., and Veldhuizen, E. J. A. (2008) Surfactant collectins and innate immunity. *Neonatology* **93**, 288–294
21. Haagsman, H. P., and Diemel, R. V. (2001) Surfactant-associated proteins: functions and structural variation. *Comp. Biochem. Physiol., Part A Mol. Integr. Physiol.* **129**, 91–108
22. Rubio, F., Cooley, J., Accurso, F. J., and 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
23. Mariencheck, W. I., Alcorn, J. F., Palmer, S. M., and Wright, J. R. (2003) *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **28**, 528–537
24. Beatty, A. L., Malloy, J. L., and Wright, J. R. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* degrades pulmonary surfactant and increases conversion in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **32**, 128–134

25. Bates, S. R., and Fisher, A. B. (1996) Surfactant protein A is degraded by alveolar macrophages. *Am. J. Physiol.* **271**, L258–266
26. Bates, S. R., Xu, J., Dodia, C., and Fisher, A. B. (1997) Macrophages primed by overnight culture demonstrate a marked stimulation of surfactant protein A degradation. *Am. J. Physiol.* **273**, L831–839
27. Veillard, F., Lecaille, F., and Lalmanach, G. (2008) Lung cysteine cathepsins: intruders or unorthodox contributors to the kallikrein-kinin system? *Int. J. Biochem. Cell Biol* **40**, 1079–1094
28. Reddy, V. Y., Zhang, Q. Y., and 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. U.S.A.* **92**, 3849–3853
29. Bailey, T. C., Maruscak, A. A., Petersen, A., White, S., Lewis, J. F., and 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
30. Linke, M., Gordon, R. E., Brillard, M., Lecaille, F., Lalmanach, G., and Brömme, D. (2006) Degradation of apolipoprotein B-100 by lysosomal cysteine cathepsins. *Biol. Chem.* **387**, 1295–1303
31. Lecaille, F., Weidauer, E., Juliano, M. A., Bromme, D., and Lalmanach, G. (2003) Probing cathepsin K activity with a selective substrate spanning its active site. *Biochem. J.* **375**, 307–312
32. Veillard, F., Saidi, A., Burden, R. E., Scott, C. J., Gillet, L., Lecaille, F., and Lalmanach, G. (2011) Cysteine Cathepsins S and L Modulate Anti-angiogenic Activities of Human Endostatin. *J. Biol. Chem.* **286**, 37158–37167
33. Griesse, M., Essl, R., Schmidt, R., Rietschel, E., Ratjen, F., Ballmann, M., and Paul, K. (2004) Pulmonary surfactant, lung function, and endobronchial inflammation in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **170**, 1000–1005
34. Noah, T. L., Murphy, P. C., Alink, J. J., Leigh, M. W., Hull, W. M., Stahlman, M. T., and 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
35. Griesse, M., von Bredow, C., and 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

36. Deb, R., Shakib, F., Reid, K., and 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
37. Shi, G. P., Webb, A. C., Foster, K. E., Knoll, J. H., Lemere, C. A., Munger, J. S., and Chapman, H. A. (1994) Human cathepsin S: chromosomal localization, gene structure, and tissue distribution. *J. Biol. Chem.* **269**, 11530–11536
38. Kos, J., Sekirnik, A., Kopitar, G., Cimerman, N., Kayser, K., Stremmer, A., Fiehn, W., and Werle, B. (2001) Cathepsin S in tumours, regional lymph nodes and sera of patients with lung cancer: relation to prognosis. *Br. J. Cancer* **85**, 1193–1200
39. Kishore, U., Greenhough, T. J., Waters, P., Shrive, A. K., Ghai, R., Kamran, M. F., Bernal, A. L., Reid, K. B. M., Madan, T., and Chakraborty, T. (2006) Surfactant proteins SP-A and SP-D: structure, function and receptors. *Mol. Immunol.* **43**, 1293–1315
40. Silveyra, P., and Floros, J. (2012) Genetic variant associations of human SP-A and SP-D with acute and chronic lung injury. *Front. Biosci.* **17**, 407–429
41. Shang, F., Rynkiewicz, M. J., McCormack, F. X., Wu, H., Cafarella, T. M., Head, J. F., and Seaton, B. A. (2011) Crystallographic complexes of surfactant protein A and carbohydrates reveal ligand-induced conformational change. *J. Biol. Chem.* **286**, 757–765
42. Head, J. F., Mealy, T. R., McCormack, F. X., and Seaton, B. A. (2003) Crystal structure of trimeric carbohydrate recognition and neck domains of surfactant protein A. *J. Biol. Chem.* **278**, 43254–43260
43. McCormack, F. X., Festa, A. L., Andrews, R. P., Linke, M., and Walzer, P. D. (1997) The carbohydrate recognition domain of surfactant protein A mediates binding to the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *Biochemistry* **36**, 8092–8099
44. McCormack, F. X., Stewart, J., Voelker, D. R., and Damodarasamy, M. (1997) 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
45. Griesse, M., Wiesener, A., Lottspeich, F., and 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
46. Hirche, T. O., Crouch, E. C., Espinola, M., Brokelman, T. J., Mecham, R. P., DeSilva, N., Cooley, J., Remold-O'Donnell, E., and 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
47. Casals, C., Miguel, E., and 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
 48. Ruano, M. L., Nag, K., Worthman, L. A., Casals, C., Pérez-Gil, J., and 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
 49. Ruano, M. L., Miguel, E., Perez-Gil, J., and Casals, C. (1996) Comparison of lipid aggregation and self-aggregation activities of pulmonary surfactant-associated protein A. *Biochem. J.* **313**, 683–689
 50. Van Iwaarden, J. F., Pikaar, J. C., Storm, J., Brouwer, E., Verhoef, J., Oosting, R. S., van Golde, L. M., and van Strijp, J. A. (1994) Binding of surfactant protein A to the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharides. *Biochem. J.* **303**, 407–411
 51. Sánchez-Barbero, F., Strassner, J., García-Cañero, R., Steinhilber, W., and Casas, C. (2005) Role of the degree of oligomerization in the structure and function of human surfactant protein A. *J. Biol. Chem.* **280**, 7659–7670
 52. Weis, W. I., Taylor, M. E., and Drickamer, K. (1998) The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol. Rev.* **163**, 19–34
 53. May, T. B., Shinabarger, D., Maharaj, R., Kato, J., Chu, L., DeVault, J. D., Roychoudhury, S., Zielinski, N. A., Berry, A., and 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
 54. LeVine, A. M., Kurak, K. E., Bruno, M. D., Stark, J. M., Whitsett, J. A., and Korfhagen, T. R. (1998) Surfactant protein-A-deficient mice are susceptible to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **19**, 700–708
 55. von Bredow, C., Birrer, P., and Griesse, M. (2001) Surfactant protein A and other bronchoalveolar lavage fluid proteins are altered in cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* **17**, 716–722
 56. Guilbault, C., Saeed, Z., Downey, G. P., and Radzioch, D. (2007) Cystic fibrosis mouse models. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **36**, 1–7

57. Bai, Y., Galetskiy, D., Damoc, E., Paschen, C., Liu, Z. Q., Griese, M., Liu, S. Y., and Przybylski, M. (2004) High resolution mass spectrometric alveolar proteomics: Identification of surfactant protein SP-A and SP-D modifications in proteinosis and cystic fibrosis patients. *Proteomics* **4**, 2300–2309
58. Liao, D. F., Yin, N. X., Huang, J., and Ryan, S. F. (1996) Effects of human polymorphonuclear leukocyte elastase upon surfactant proteins in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* **1302**, 117–128
59. Quinn, D. J., Weldon, S., and Taggart, C. C. (2010) Antiproteases as therapeutics to target inflammation in cystic fibrosis. *Open Respir. Med. J.* **4**, 20–31
60. Garcia-Verdugo, I., Tanfin, Z., and Breuiller-Fouche, M. (2010) Surfactant protein A: an immunoregulatory molecule involved in female reproductive biology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 1779–1783
61. Gibson, R. L., Burns, J. L., and Ramsey, B. W. (2003) Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 918–951
62. Small, D., Burden, R., and Scott, C. (2011) The Emerging Relevance of the Cysteine Protease Cathepsin S in Disease. *Clin. Rev. Bone Miner. Metab.* **9**, 122–132
63. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **14**, 33–38, 27–28

Acknowledgements - We have a thought for our friend Michèle Brillard, who passed away on June 2011. We acknowledge MB for N-terminal sequencing. We thank Dr Serge Guyetant who provided the lung tissue sections (Department of Anatomy and Cytology, Bretonneau Hospital, University Hospital, Tours & INSERM UMR 1100/CEPR, Université François Rabelais, Tours, France). Dr G. Couetdic and Dr P. Plésiat (Laboratoire de Bactériologie, CHU Jean Minjoz, Besançon, France) kindly supplied sputum samples. We thank Amanda Kravtsoff for support during her Master internship and Dr Kevin Baranger (present address: Neurobiologie des interactions cellulaires et neurophysiopathologie, UMR 7259, Marseille, France) for technical advices. Mu-Leu-Hph-VSPH (cathepsin S inhibitor) was kindly provided by Dr J.H. McKerrow (University of California, San Francisco, CA, USA). We are grateful to Daniel Bourry for his technical assistance (iconography facilities, Université François Rabelais, Faculté de Médecine, Tours).

FOOTNOTES

* We are indebted to the French cystic fibrosis association “Vaincre la Mucoviscidose” for their financial support (VLM, France, Grant IC0810). This work was also supported by institutional funding from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). CN was a recipient of a doctoral fellowship from VLM. AJ-G is supported by la Région Centre (France, FibroCat project).

¹ To whom correspondence should be addressed: Gilles Lalmanach, PhD, INSERM, UMR 1100 « Pathologies Pulmonaires: Protéolyse et Aérosolthérapie » / CEPR, Université François Rabelais, Faculté de Médecine, 10 Boulevard Tonnellé, F - 37032 Tours cedex, France. Tel: (+33) 247366151; Fax: (+33) 247366046; e-mail: gilles.lalmanach@univ-tours.fr

² Abbreviations: Abz, ortho-aminobenzoic acid; AMC, 7-amino-4-methyl coumarin; Cat, cathepsin; CF, cystic fibrosis; DPPC, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine; DPPG, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol; DTT, DL-dithiothreitol; E-64, L-3-carboxy-trans-2,3-epoxypropionyl-leucylamido- (4-guanidino) butane; IHC, Immunohistochemistry; 3-NO₂-Tyr, 3-nitro-tyrosine; NSP, neutrophil serine protease; Ps+, *Pseudomonas aeruginosa*-positive; Ps-, *P. aeruginosa*-negative; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; RT, room temperature; SP-A, surfactant protein A; TBS, Tris Buffer Saline; Z, benzyloxycarbonyl.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. SP-A is degraded in CF sputum and is susceptible to hydrolysis by sputum Cats. (A) Status of SP-A in cell-free CF supernatants isolated from sputum of *P. aeruginosa* positive (Ps+) or negative (Ps-) patients (representative samples). CF supernatants (corresponding to 30 µg protein) were analysed by Western blotting with a polyclonal anti-SP-A antibody, prior 15% SDS-PAGE under reducing conditions. Black triangle, dimeric form; white triangle, monomeric form. (B) Time-dependent hydrolysis of exogenous SP-A by sputum Cats. SP-A (0.6 µg) was incubated with supernatants of CF sputum at 30°C for 0-8 h in 0.1 M sodium acetate, pH 5.5, 5 mM DTT, 0.01% Brij35 in the presence of 0.5 mM PMSF and 40 µM pepstatin A. Alternatively, supernatants were pre-incubating with Mu-Leu-Hph-VSPh (VS), a Cat S inhibitor, or E-64. The reaction products were submitted to electrophoresis (15% SDS-PAGE under reducing conditions), and immunoblotted in the presence of anti-SP-A antibody. (C) Cleavage of SP-A by sputum Cats at pH 7.4. Samples were treated as described above in 0.1 M sodium phosphate, pH 7.4, 5 mM DTT, 0.01% Brij35, during 0-4 h.

FIGURE 2. SP-A and Cat S are co-localized in human lung alveolar space (IHC analysis). (A) Serial sections of alveolar lung tissue were prepared from normal lung biopsies. Immunodetection of TTF-1, a nucleus marker of type II pneumocytes (PII). Staining was performed using 3', 3-diaminobenzidine chromogen (brown precipitate). (B) Immunostaining of SP-A. (C) Immunostaining of Cat S. (M, macrophage).

FIGURE 3. Human SP-A is specifically cleaved by Cat S. (A) SP-A (3 µg) was incubated with increasing concentrations of purified Cat K (○), L (▲) and S (■) (0-200 nM) in 0.1 M sodium acetate, pH 5.5, 2 mM DTT, 0.01% Brij35, at 37°C for 10 min. The cleavage products of SP-A at pH 5.5 (B) or pH 7.4 (C) were visualized by Coomassie staining after 15% SDS-PAGE in reduced conditions.

FIGURE 4. Cat S cleaves human SP-A within its carbohydrate recognition domain (CRD). (A) Amino acids sequence of the coiled-coil neck region and the CRD (Met112-Phe228) (Swiss Prot access: Q8IWL2). Solvent exposed loop (Ser181-Gln203) of CRD is underlined. Cleavage sites were identified by N-terminal sequencing. Residues implicated in carbohydrate recognition are framed. Residues implicated in phospholipids binding are highlighted. The

major cleavage site is indicated by a black triangle. The two minor cleavage sites are indicated by a white triangle. (B) Cartoon representation of human SP-A (Visual Molecular Dynamics, (63)). The structure of homology-based model of human SP-A was performed with 3D-JIGSAW modeling server (www.bmm.icnet.uk/~3djigsaw) using as template the structure of rat SP-A (monomeric form; pdb: 1R14) sharing 80% of homology.

FIGURE 5. Cleavage of SP-A by Cat S alters sugar binding. SP-A (3 μ g) was incubated with Cat S (100 nM) in 0.1 M sodium acetate, pH 5.5 or 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM DTT, 0.01% Brij35, 2 mM CaCl_2 at 37°C for 1 h. The samples were then transferred into mannan-coated wells, and the binding of SP-A to the sugar moiety was determined spectrophotometrically (450 nm). Bars (white bar, pH 5.5; grey bar, pH 7.4) correspond to median $\pm$ high/low values (n=3). * $P < 0.05$, non-parametric Friedman test.

FIGURE 6. Cat S impairs the Ca^{2+} -dependent aggregation properties of SP-A. (A) Self-aggregation. SP-A (3 μ g) was incubated alone (■) or with Cat S (100 nM) (●) in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5, 4 mM GSH, 0.01% Brij35 (buffer A), for 1 h at 37°C (final volume: 20 μ l), before adding E-64 (5 μ M). Control was made in the presence of E-64-treated Cat S (Δ). Samples were further mixed with 25 mM HEPES buffer, pH 7.4, 0.2 mM EDTA, 8 mM GSSG (buffer B) at 37°C (final volume: 600 μ l). Ca^{2+} (2.5 mM) was added after 10 min then EDTA (5 mM) after 40 min. Self-aggregation was monitored at 360 nm. (B) Vesicle aggregation. SP-A (5 μ g) was incubated alone (■) or with cat S (100 nM) (●) in buffer A for 2 h at 37 ° C (final volume 20 μ l), then E-64 (5 μ M) was added. Controls were made in the presence of E-64-treated Cat S (Δ) or heat-inactivated Cat S ($\blacklozenge$). Samples were further added to DPPC/DPPG (60 μ g/ml) mixed to buffer B (final volume: 600 μ l) at 37°C. The aggregation of DPPC/DPPG vesicles was monitored at 400 nm in the presence of Ca^{2+} (2.5 mM) as described in “Material & Methods”. (C) Rc-LPS aggregation. A similar protocol was used for studying aggregation of Rc-LPS vesicles (40 μ g/ml), except that SP-A (12 μ g) was incubated with Cat S for 4 h. Additionally a competition experiment was performed in the presence of mannan (10 mg/ml) ($\circ$). Control: self-aggregation of LPS ($\bullet$). All data points are the mean values of experiments performed in triplicate $\pm$ S.D.

FIGURE 7. Cleavage of SP-A by Cat S alters the agglutination of *E. coli*. SP-A (6 μ g) was incubated alone ($\circ$) or with Cat S (100 nM) ($\blacktriangle$) for 1 h at 37°C in 0.1 M sodium acetate, pH

5.5, 2 mM DTT, 0.01% Brij35 (final volume: 600 μ l). Alternatively experiments were performed by pre-incubation of Cat S with E-64 (■). Mixtures were added to log-phase *E. coli* (2.5×10^8 bacteria/ml) in 25 mM HEPES buffer, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM Ca^{2+} . Control: bacteria alone (◇). Agglutination was monitored spectrophotometrically at 700 nm over 2 h at room temperature. Inset corresponds to the agglutination assays in test tubes (identical concentrations; volume: 3 ml).

FIGURE 8. Cleavage of SP-A by Cat S abrogates the agglutination of *P. aeruginosa*. (A) SP-A (3 μ g) was incubated alone (○) or with Cat S (100 nM) (▲) for 1 h at 37°C in 0.1 M sodium acetate, pH 5.5, 2 mM DTT, 0.01% Brij35. Alternatively, experiments were performed by pre-incubation of Cat S with E-64 (■). Reaction mixtures were further added to log-phase *P. aeruginosa* (3×10^7 bacteria/ml) (Final volume: 200 μ l). Control: bacteria alone (◇). Agglutination was monitored at 570 nm over 3 h (room temperature). (B) Additionally the reactions were visualized as described in the experimental section by (a) optical microscopy and by (b) fluorescence microscopy: DAPI dying (blue). Row 1, bacteria; row 2, Cat S; row 3, SP-A (aggregation with formation of clumps); row 4, SP-A in the presence of Cat S; row 5, SP-A in the presence of E-64 treated-Cat S (aggregation with formation of clumps).

Figure 1

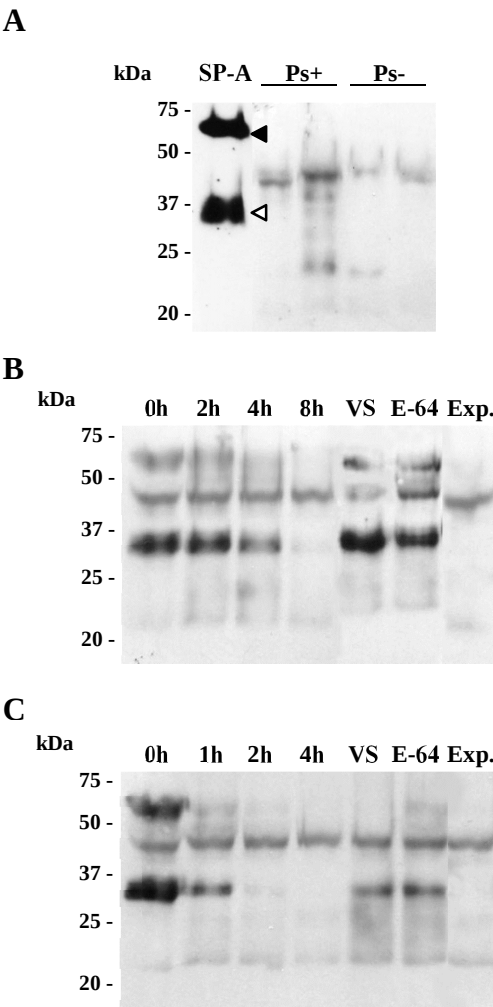


Figure 2

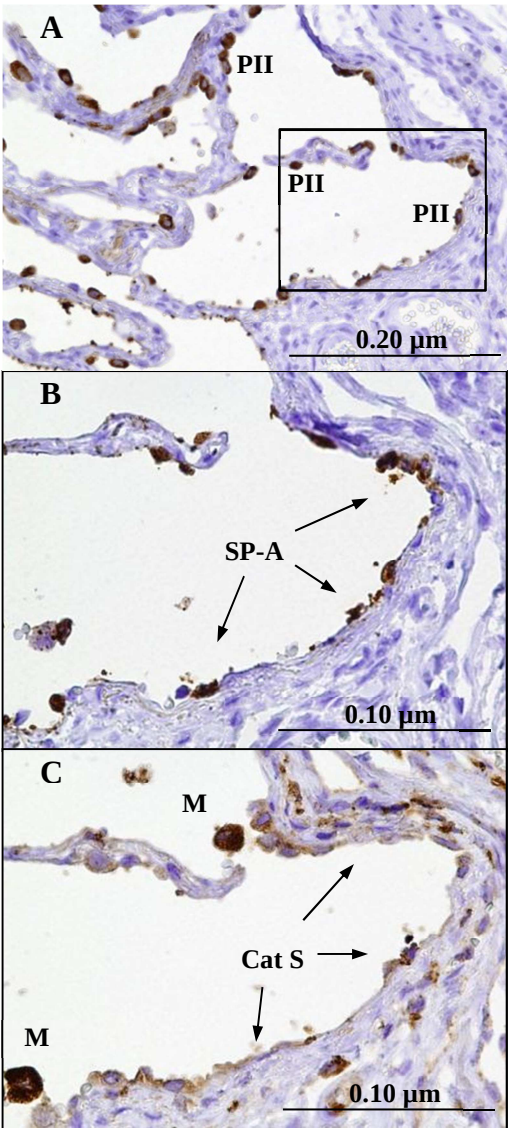


Figure 3

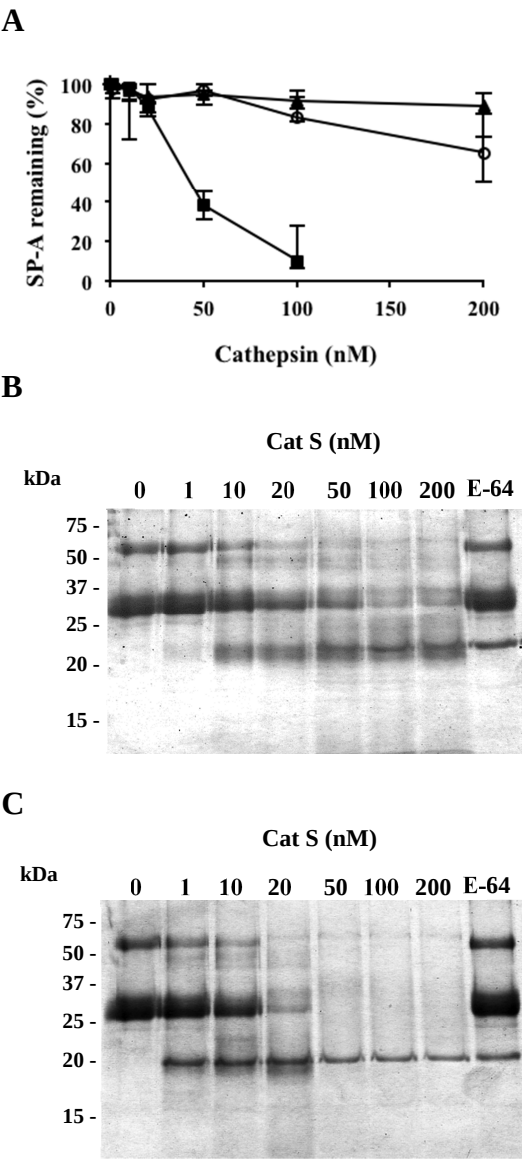


Figure 4

A

AHLDEELQAT LHD[▽]FRHQILQ TRGALSLQGS¹¹⁰
 IMTVGEKVFS SNGQSITFDA IQEACARAGG¹⁴⁰
 RIAVPRNPEE NEAIA[■]SFVKK YNTYAYVGLT¹⁷⁰
 EGPSPGDFRY SDGTPVNYTN WY[▽]RGE[□]PAG[□]RG[□]²⁰⁰
K[□]E[□]QCVEMYTD GQW[□]ND[□]RNCLY SRLTICEF²²⁸

B

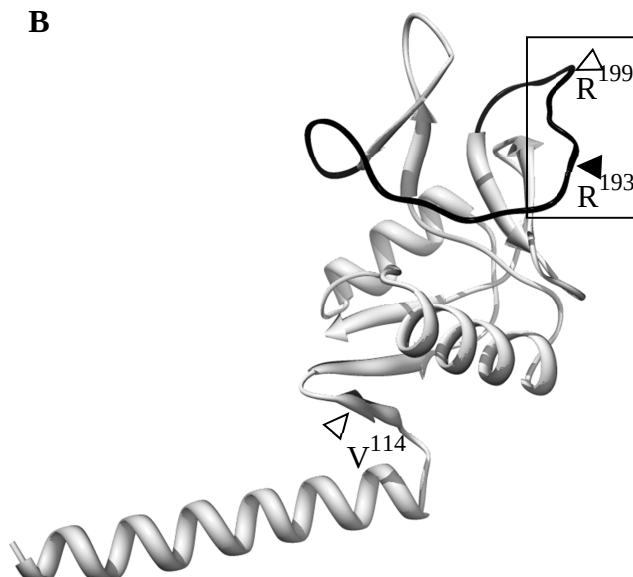


Figure 5

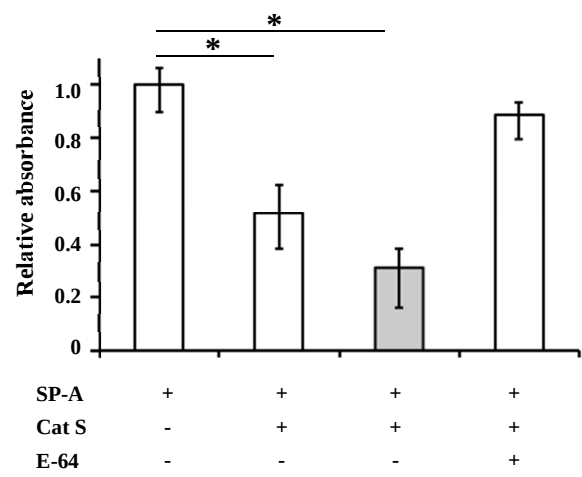


Figure 6

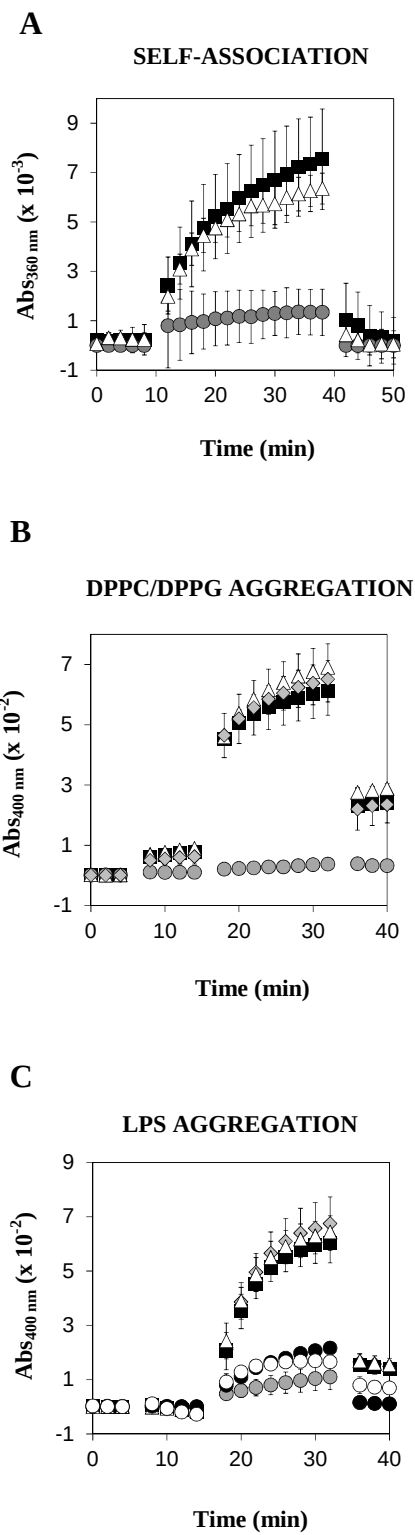


Figure 7

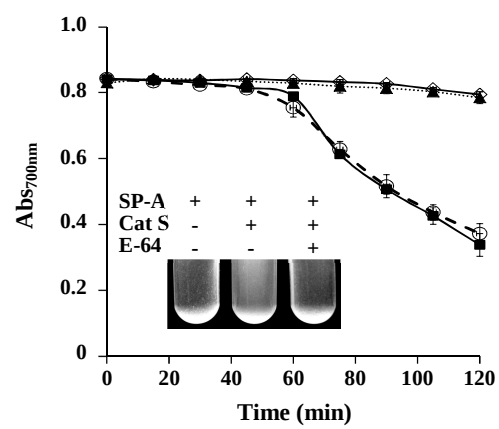
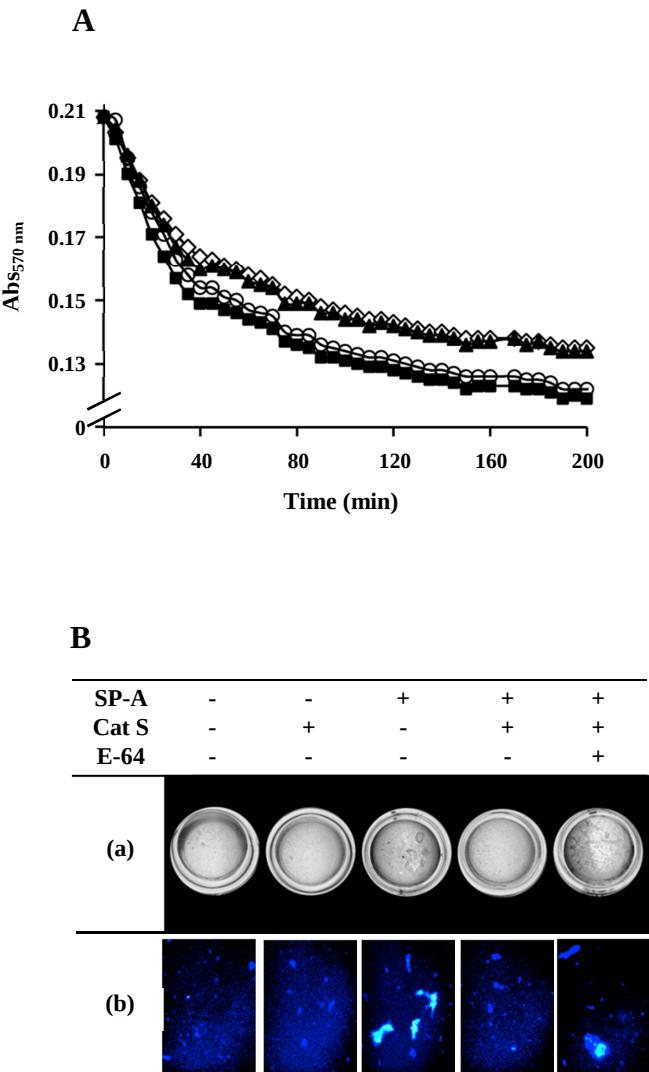


Figure 8



Rôle de la cathepsine S dans le remodelage de la membrane basale et régulation de son activité par des glycosaminoglycanes

Résumé

Le renouvellement de la membrane basale et de la matrice extracellulaire lors de processus physiologiques ou pathologiques (réparation tissulaire, angiogenèse, inflammation, cancer) fait intervenir de nombreuses protéases dont les cathepsines à cystéine. Après avoir étudié leur localisation dans l'épiderme à proximité de la jonction dermo-épidermique et leur sécrétion par les kératinocytes, nous avons montré la capacité de la cathepsine S à dégrader efficacement les principales protéines de la membrane basale (laminine, collagène IV, perlécan) et plus particulièrement le nidogène-1, qui est essentiel à l'organisation architecturale de la membrane basale via de multiples interactions avec les autres constituants. Parmi plusieurs glycosaminoglycanes présents dans la matrice extracellulaire, le chondroïtine 4-sulfate est capable de se complexer avec la cathepsine S, via trois sites potentiels de fixation dont un au niveau de son site actif, et d'inhiber son activité enzymatique de façon dose-dépendante. L'expression et l'activité de la cathepsine S au niveau de l'épiderme diminuent au cours du vieillissement cutané, alors que l'expression du nidogène-1 reste stable. La cathepsine S jouerait donc un rôle important aux côtés d'autres protéases dans le remodelage de la membrane basale.

Mots-clés : Cathepsines à cystéine, glycosaminoglycanes, membrane basale, nidogène, peau, vieillissement.

Abstract

Basement membrane (BM) and extracellular matrix (ECM) turnover during physiological or pathological events (tissue repair, angiogenesis, inflammation, cancer) involves numerous proteases including cysteine cathepsins. Cathepsins expression in skin epidermis near dermal-epidermal junction and their secretion by keratinocytes were first analyzed. We showed that cathepsin S degrades efficiently main BM components (laminin, type IV collagen, perlecan) and particularly nidogen-1 that is essential for BM architecture. Among several glycosaminoglycans present in ECM, chondroitin 4-sulfate is able to form a stable complex with cathepsin S. Three predicted binding sites including one closed to its active site were identified. Further, C4-S inhibits cathepsin S activity in a dose-dependent manner. The expression and activity of cathepsin S in epidermis are decreased upon skin aging while nidogen-1 expression remains unchanged. Cathepsin S besides other proteases may play an important role in BM remodeling.

Keywords : Aging, basement membrane, cysteine cathepsins, glycosaminoglycans, nidogen, skin.