

UNIVERSITÉ FRANÇOIS – RABELAIS DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE SSBCV

INSERM UMR-1100 : « Pathologies respiratoires : protéolyse et aérosolthérapie »

Centre d'Étude des Pathologies Respiratoires

THÈSE présentée par : Pierre-Marie ANDRAULT

Soutenue le : 17 décembre 2015

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 des cathepsines à cystéine dans la régulation du peptide antimicrobien LL-37 lors de pathologies inflammatoires chroniques pulmonaires

THÈSE dirigée par :
Mr LECAILLE Fabien

Maître de Conférences HDR, Université François Rabelais, Tours

RAPPORTEURS :
Mr DEBELLE Laurent
Mr DRIDER Djamel

Professeur, Université de Reims Champagne Ardenne, Reims
Professeur, Université de Lille I, Lille

JURY :

Mr BIREMBAUT Philippe
Mr DEBELLE Laurent
Mr DRIDER Djamel
Mme LALMANACH Anne-Christine
Mr LALMANACH Gilles
Mr LECAILLE Fabien
Mme REBOUD-RAVAUX Michèle

Professeur, Université de Reims Champagne Ardenne, Reims
Professeur, Université de Reims Champagne Ardenne, Reims
Professeur, Université de Lille I, Lille
Chargée de recherche HDR, INRA, Tours
Professeur, Université François Rabelais, Tours
Maître de Conférences HDR, Université François Rabelais, Tours
Professeur, Université Pierre et Marie Curie, Paris

Je dédicace cette thèse à mon frère, toi qui as suivi la même voie que moi et qui m'aurait sûrement encouragé à persévérer dans celle-ci. Bien que depuis ce jour de mai 2003 tu aies fait le choix de nous quitter, sache que même si cette décision a été dure à accepter, je l'ai toujours respectée. On grandit à tout âge et même si aujourd'hui je regrette de ne plus pouvoir grandir avec toi, je sais que là où tu es, tu as trouvé la paix que tu cherchais tant.

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué à l'INSERM U1100 « Pathologies respiratoires : protéolyse et aérosolthérapie » - Centre d'Étude des Pathologies Respiratoires dirigée par le Dr Mustapha Si-Tahar à Tours et a pu être financé grâce à une allocation de recherche cofinancée par **la Région Centre-Val de Loire** et **l'INSERM**.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à :

Monsieur **Fabien Lecaille**, Maître de Conférences à l'Université François Rabelais pour avoir assuré la direction scientifique de ce travail de thèse. Merci pour ta confiance, ta disponibilité et tes précieux conseils, tu m'as appris ce que sont la persévérance et l'enthousiasme, deux qualités indispensables dans le monde de la recherche.

Monsieur **Gilles Lalmanach**, Professeur à l'Université François Rabelais, pour m'avoir accueilli au sein de son groupe de recherche, merci pour ton soutien et ta disponibilité et pour votre bonne humeur communicative à Fabien et à toi.

Monsieur **Djamel Drider**, Professeur à l'Université de Lille I, et Monsieur **Laurent Debelle**, Professeur à l'Université de Reims Champagne-Ardenne, pour me faire l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail de thèse.

Madame **Anne-Christine Lalmanach**, Chargée de Recherche INRA au centre de recherche INRA Val de Loire, Université François Rabelais, Madame **Michèle Reboud-Ravaux**, Professeur à l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI) et Monsieur **Philippe Birembaut**, Professeur à l'Université de Reims Champagne-Ardenne, d'avoir accepté d'être les examinateurs de cette thèse.

Monsieur **Mustapha Si-Tahar**, Directeur de Recherche de l'INSERM UMR 1100 « Pathologies respiratoires : protéolyse et aérosolthérapie », pour m'avoir accueilli au sein de son unité.

Je tiens également à remercier...

...mes amis que j'ai connus sur les bancs de la faculté...

Cyrielle Corbin, même si tu as été très prise par ta thèse durant ces trois ans, merci pour ton amitié, ta bonne humeur et ton soutien, et ce depuis le M1 (d'autant plus que te voilà docteur à présent ;)). **Rémy Robinot**, on se souviendra des quelques cours en amphithéâtre où l'on a bien failli devenir narcoleptiques (la loi d'action de masse dès le matin, aïe, elle n'a jamais aussi bien porté son nom), et surtout pour ces moments mémorables à « l'Aca »...

...et ceux que j'ai connus au laboratoire...

Juliette Sage, dont je n'ai pas été le stagiaire ! ;), merci à toi la « miss cosmétique » de l'équipe :) pour ta gentillesse et pour m'avoir guidé durant mes débuts au labo, **Alix Joulin-Giet**, pour ta bonne humeur, ton soutien durant les débuts de ma thèse et aussi ta capacité à me sortir des répliques comportant un double sens flagrant avec une décontraction désarmante, **Flora Paul**, la seule fille que je connaisse qui parle à son ordinateur et s'indignerait presque de ne pas avoir de réponse de sa part, ton petit grain de folie m'a manqué, **Clarisse Dubray**, pour ton affection et son énergie débordante, **David Ginguene** pour les nombreuses discussions qu'on a pu avoir entre passionnés, merci pour ton soutien, **Christophe Epinette**, le « king of the lab » qui a sa photo placardée dans le laboratoire maintenant, merci Carla ;), **Clémence Henry**, pour ton sens de l'écoute et ta bienveillance, **Thibaut Garenne** et **Mylène Wartenberg**, pour leur sympathie et leurs questions en tout genre durant leur période de stage, et avec qui nous avons pu confirmer que la papaine diluée dans de l'eau ça ne marche définitivement pas ;) (la recherche avance), **Thomas Cornet** que j'ai eu en stage durant ses années de L2 et L3 pour son sérieux et sa bonne volonté et **James Stewart**, mon stagiaire originaire de Caroline du Nord, pour son enthousiasme et sa passion communicative aussi bien pour la recherche que pour l'histoire de son pays et pour m'avoir permis d'enrichir mon anglais :).

Mariana Kasabova, *ти си една скъпоценна приятеля от България* ;), merci Mariana pour ton amitié sincère, les fous rires en tout genre (Tonton Vladimir, les expressions Belges, etc.) et tout le soutien que tu m'as apporté durant ces trois années de thèse, même après que tu aies quitté le labo, il m'aurait été difficile de me passer d'une amie comme toi.

... ainsi que mes collègues de l'U1100

Ahlame Saïdi, pour m'avoir guidé sur mes quelques manips de culture cellulaire, pour ta patience et ta gentillesse, **Lise Vanderlynden**, pour m'avoir donné un sérieux coup de main sur la fin de ma thèse, **Mélia Magnen**, adepte de la secte du poney avec Lise :), pour ta gentillesse et ta spontanéité, **Carla Guarino**, l'archétype de l'italienne survoltée : sûrement le café (*Nespresso, what else ?*), **Christelle Parent**, qui m'a toujours rendu service quand j'en ai eu besoin, **Estelle Nocchi**, pour avoir pris le temps de m'expliquer les procédures administratives inhérentes à une structure de recherche (ordres de mission, commandes, etc.), pour ton efficacité et ta gentillesse.

Je tiens également à remercier l'ensemble des personnes que j'ai côtoyé au quotidien pour leur accueil et leur gentillesse: **Anne-Sophie Lamort**, **Yveline Hamon**, **Aurélien Fradin**, **Marie-Louise Zani**, **Thierry Moreau**, **Rose-France Aïmar**, **Delphine Fouquet**, **Sandrine Dallet-Choisy**, **Sylvie Attucci**, **Frédéric Esnard**, **Annick Esnard**, **Yves Courty**, **Agnès Petit**, **Virginie Hervé**, **Natalie Heuzé-Vourc'h**, **Pascale Reverdiau**, **Sophie Iochmann**, **Fabien Gueugnon**, **Eric Morello**, **Antoine Guillon**, **Thomas Baranek**, **Déborah Bréa**, **Emilie Dalloneau**, **Alexandre Valayer**, **Chloé Boisseau** et ceux que j'aurais éventuellement oubliés, veuillez m'en excuser.

Enfin je remercie mes parents, ma sœur (à qui je ne peux pas parler de solution tampon sans qu'elle s' imagine une éprouvette remplie de Tampax :)) qui va être maman pour la première fois et mon beau-frère, pour leur soutien durant ces trois ans.

Résumé

Lors de pathologies pulmonaires inflammatoires chroniques comme la mucoviscidose ou la BPCO, le déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases aboutit à la dégradation du tissu pulmonaire et à l'inactivation des défenses antimicrobiennes. Les cathepsines à cystéine participent à l'inactivation protéolytique de peptides et protéines antimicrobiens (PAMs) pulmonaires comme le SLPI, la lactoferrine, et les β -défensines -2 et -3 lors de l'emphysème ou de la mucoviscidose. Lors de cette thèse, nous avons étudié la capacité des cathepsines à cystéine B, K, L et S à hydrolyser le peptide LL-37, qui est un PAM important dans l'immunité innée pulmonaire. Seules les cathepsines K et S clivent le LL-37 et inactivent efficacement son activité antimicrobienne. A l'inverse, le LL-37 est un inhibiteur compétitif de la cathepsine L. D'autre part, l'expression pulmonaire de la cathepsine S est fortement augmentée chez les individus fumeurs atteints ou non de BPCO. La fumée de cigarette qui est une source importante de stress oxydatif induit une augmentation significative de l'expression et l'activité de la cathepsine S. Malgré un environnement oxydatif non favorable à l'activité des cathepsines, la cathepsine S parvient à hydrolyser le peptide LL-37 et pourrait ainsi augmenter le risque d'exacerbation lors de la BPCO.

Mots clé : cathepsines à cystéine, peptides antimicrobiens, LL-37, inflammation pulmonaire

Abstract

During chronic inflammatory lung diseases like cystic fibrosis or COPD, proteases/antiproteases imbalance leads to pulmonary tissue degradation and compromise antimicrobial barrier. Cysteine cathepsins are involved in the proteolytic inactivation of several lung antimicrobial peptides (AMPs) such as SLPI, lactoferrin and β -defensins -2 and -3 during emphysema or cystic fibrosis. During this thesis, we studied the ability of cathepsins B, K, L and S to degrade LL-37, which is an important AMP in lung immunity. Only cathepsins K and S degrade readily LL-37 and inactivate its antimicrobial property. Conversely, LL-37 is a competitive inhibitor of cathepsin L. Beside, lung expression of human cathepsin S is significantly increased in smokers with or without COPD compared to non-smokers. Cigarette smoke that is a major source of oxidative stress significantly increases the expression and activity of cathepsin S. Despite an unfavorable oxidative environment, cathepsin S retains its proteolytic activity toward LL-37 and thus could participate to COPD exacerbation.

Key words: Cysteine cathepsins, antimicrobial peptides, LL-37, lung inflammation

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. Les cathepsines à cystéine humaines.....	31
1.1. Généralités	32
1.1.1. Classification et phylogénie	32
1.1.2. Structure	34
1.1.3. Fonctionnement et organisation du site catalytique	38
1.1.4. Spécificité enzymatique des cathepsines à cystéine.....	40
1.1.5. Particularité des exopeptidases.....	41
1.1.6. Localisation cellulaire des cathepsines à cystéine.....	42
1.2. Régulation des cathepsines à cystéine	44
1.2.1. Régulation transcriptionnelle	45
1.2.2. Régulation par le pH et la force ionique.....	45
1.2.3. Régulation par le stress oxydatif	47
1.2.4. Régulation par les glycosaminoglycanes	47
1.2.1. Inhibiteurs endogènes spécifiques : superfamille des cystatines.....	49
1.2.2. Autres inhibiteurs non spécifiques	53
1.2.3. Inhibiteurs synthétiques.....	54
1.3. Fonctions physiologiques et pathologiques des cathepsines à cystéine	58
1.3.1. Fonctions physiologiques	58
1.3.2. Fonctions physiopathologiques	63
1.4. Les cathepsines à cystéine dans les pathologies pulmonaires	67
1.4.1. L'inflammation pulmonaire	67
1.4.2. Le stress oxydatif.....	68
1.4.3. La balance protéases/antiprotéases.....	71
1.4.4. Les cathepsines à cystéine dans l'inflammation pulmonaire	72
1.4.5. Cibles moléculaires des cathepsines dans les pathologies pulmonaires.....	81

2. Les peptides et protéines antimicrobiens humains	85
2.1. Généralités	85
2.2. Structure et classification des peptides antimicrobiens	86
2.2.1. Les peptides structurés en hélice- α	86
2.2.2. Les peptides en feuillets- β stabilisés par des ponts disulfures	87
2.2.3. Les peptides riches en certains acides aminés.....	88
2.2.4. Les peptides issus de protéines et les protéines antimicrobiennes	88
2.2.5. Expression et bio-distribution	89
2.2.6. Mécanismes d'action	90
2.3. Les PAMs et essais thérapeutiques	93
2.4. Les PAMs pulmonaires chez l'Homme	94
2.4.1. Le lysozyme et la lactoferrine	94
2.4.2. Les inhibiteurs de protéases à activité antimicrobienne	96
2.4.3. Les défensines	98
2.4.4. La cathélicidine LL-37	99
2.4.5. Les protéines du surfactant A et D (SP-A et SP-D)	100
2.4.1. Autres PAMs	101
2.5. Fonctions immuno-modulatrices des PAMs pulmonaires	104
2.5.1. Neutralisation du LPS	104
2.5.2. Chimiotactisme.....	104
2.5.3. Modulation de l'expression de cytokines	104
2.6. Les PAMs dans les pathologies pulmonaires	105
2.6.1. Inactivation indépendante de la protéolyse	105
2.6.2. Inactivation protéolytique.....	107
3. Objectifs de la thèse.....	109
II- Travaux personnels.....	111
1. Régulation de la cathélicidine LL-37 par les cathepsines à cystéine humaines B, K, L et S ..	113
2. Les cathepsines à cystéine dans la BPCO	131
Conclusion générale et perspectives	187
Bibliographie.....	197
Annexes.....	249

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des cathepsines à cystéine humaines	35
Tableau 2: Résidus constituant la poche S2 des différentes cathepsines	41
Tableau 3 : Valeurs des constantes d'inhibition (K_i) des inhibiteurs endogènes des cathepsines à cystéine	50
Tableau 4 : Inhibiteurs thérapeutiques de cathepsines à cystéine en essais cliniques.....	57
Tableau 5 : Constituants de la matrice extracellulaire et de la membrane basale dégradés par les cathepsines à cystéine	62
Tableau 6 : Expression des cathepsines à cystéine pulmonaires.....	73
Tableau 7 : Classification clinique de la BPCO selon le degré de sévérité (GOLD).....	75
Tableau 8 : Classification et bio-distribution des principaux PAMs humains	89
Tableau 9 : Dérivés de PAMs humains en cours d'essais cliniques	94
Tableau 10 : Propriétés physico-chimiques, expression, concentration, régulation et activité des PAMs pulmonaires.....	103

Liste des figures

Figure 1 : Structures tridimensionnelles des procathepsines B et L	36
Figure 2 : Structures tridimensionnelles des cathepsines B et L.....	38
Figure 3 : Mécanisme catalytique des protéases à cystéine	39
Figure 4 : Nomenclature de Schechter et Berger	39
Figure 5 : Représentation par modélisation informatique de l'interaction entre le site actif de la cathepsine K et un substrat peptidique.....	40
Figure 6 : Caractéristiques structurales des cathepsines à cystéine à activité exopeptidasique.....	41
Figure 7: Voies d'adressage et localisation cellulaire des cathepsines à cystéine.....	43
Figure 8 : Activité <i>in vitro</i> des cathepsines à cystéine en fonction du pH	46
Figure 9 : Potentiel de surface des cathepsines K, S, L, B et V.....	49
Figure 10 : Schéma de la structure des kininogènes humains.....	52
Figure 11 : Structure tridimensionnelle de la cystatine F et du complexe entre la stéfine A et la cathepsine B	53
Figure 12 : Structure des principaux inhibiteurs synthétiques des cathepsines à cystéine	56
Figure 13 : Rôle des protéases à cystéine dans la présentation antigénique par le CMH de classe II.....	59
Figure 14 : Profil d'expression des cathepsines à cystéine dans le microenvironnement tumoral	66
Figure 15 : Régulation des systèmes oxydants et antioxydants pulmonaires	70
Figure 16 : Détection des cathepsines B, L, H, K, S, W et X pulmonaires.....	73
Figure 17: Exemple de courbes volume-temps obtenues par spirométrie	75
Figure 18 : Représentation schématique d'une jonction serrée.....	83
Figure 19 : Rôle des peptides antimicrobiens dans la réponse immunitaire innée	86
Figure 20 : Représentation en roue hélicoïdale de la cathélicidine LL-37.....	87
Figure 21 : Structure tridimensionnelle de l' α -défensine humaine HNP-1 et de la β -défensine humaine HBD-2.	87
Figure 22 : Schéma de la structure de la paroi des bactéries à Gram positif et à Gram négatif.	90
Figure 23 : Interaction des peptides antimicrobiens cationiques avec la membrane plasmique de cellules eucaryotes et procaryotes.	91
Figure 24 : Mécanismes d'action des peptides antimicrobiens sur la membrane plasmique des pathogènes.....	92
Figure 25 : Structure tridimensionnelle des principaux PAMs pulmonaires	102
Figure 26 : Statut du LL-37/hCAP-18, du SP-A et de la β -défensine HBD-2 dans des expectorations de patients atteints de mucoviscidose colonisés (Ps+) ou non (Ps-) par <i>P. aeruginosa</i>	116
Figure 27 : Alignement des séquences du propeptide de la cathepsine L avec le LL-37 et le SE-37.....	191

Figure 28 : Superposition du peptide LL-37 (en position substrat et inversé) avec le propeptide de la cathepsine L.....	192
Figure 29 : Détection par Western Blot de la cystatine C dans des expectorations de patients atteints de BCPO stable ou en phase d'exacerbation.	195
Figure 30 : Représentation de l'inactivation enzymatique au cours du temps en présence de concentrations croissantes d'agent inactivant.	283

Publications liées à la thèse:

Articles publiés (revues indexées à comité de lecture) (3)

- 2016 Antimicrobial Proteins and Peptides in Human Lung Diseases: A Friend and Foe Partnership with Host Proteases (revue générale: **Annexe 1**)

Fabien Lecaille, Gilles Lalmanach & Pierre-Marie Andrault

Biochimie, DOI: 10.1016/j.biochi.2015.08.014

- 2015 Antimicrobial Peptide LL-37 Is Both a Substrate of Cathepsins S and K and a Selective Inhibitor of Cathepsin L

Pierre-Marie Andrault, Sergey A. Samsonov, Gunther Weber, Laurent Coquet, Kamran Nazmi, Jan G. M. Bolscher, Anne-Christine Lalmanach, Thierry Jouenne, Dieter Brömme, M. Teresa Pisabarro, Gilles Lalmanach & Fabien Lecaille

Biochemistry, 54, 2785–2798

- 2013 Specific Cleavage of the Lung Surfactant Protein A by Human Cathepsin S May Impair its Antibacterial Properties (**Annexe 2**)

Fabien Lecaille, Clément Naudin, Juliette Sage, Alix Joulin-Giet, Agnès Courty, Pierre-Marie Andrault, Ruud A.W. Veldhuizen, Fred Possmayer & Gilles Lalmanach

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 45, 1701–1709

Article en préparation:

Regulation of Cathepsin S Expression and Activity by Cigarette Smoke in Airway Epithelium of COPD Patients

Pierre-Marie Andrault, Andrea Schamberger, Lise Vanderlynden, Serge Guyetant, Agnès Petit, Oliver Eickelberg, Yves Courty, Gilles Lalmanach & Fabien Lecaille

Participation à des colloques nationaux et internationaux:

Communications orales (3)

- 2015 The Janus face of the antimicrobial peptide LL-37: both an effective substrate of lung cathepsins S and K and a selective inhibitor of cathepsin L.

Pierre-Marie Andrault, Gunther Weber, Laurent Coquet, Thierry Jouenne, Sergey A. Samsonov, M. Teresa Pisabarro, Kamran Nazmi, Jan G. M. Bolscher, Gilles Lalmanach & Fabien Lecaille

9th European Young Cystic Fibrosis Investigator Meeting - 18 au 20 Février 2015 - Paris, France

- 2014 The Janus face of LL-37: both an inhibitor and a substrate of cysteine cathepsins
Pierre-Marie Andrault, Gunther Weber, Laurent Coquet, Thierry Jouenne, Sergey A. Samsonov, M. Teresa Pisabarro, Kamran Nazmi, Jan G. M. Bolscher, Gilles Lalmanach & Fabien Lecaille
 4th International Symposium on Antimicrobial Peptides - 4 au 6 Juin 2014 - Lorient, France
- 2014 LL-37: un peptide antimicrobien à la fois substrat et inhibiteur de cathepsines
Pierre-Marie Andrault*, Gunther Weber, Gilles Lalmanach & Fabien Lecaille
 27^{ème} Colloque Biotechnocentre – 9 et 10 Octobre 2014 – Seillac, France
**Prix de la meilleure communication orale*

Communications par affiches (6)

- 2015 Cigarette smoke enhances active cathepsin S expression in airway epithelium of patients with COPD
Pierre-Marie Andrault, Andrea Schamberger, Lise Vanderlynden, Agnès Petit, Oliver Eickelberg, Yves Courty, Gilles Lalmanach & Fabien Lecaille.
 *28^{ème} colloque Biotechnocentre - 15 et 16 Octobre 2015 - Seillac, France
 *11^{ème} Journées de Recherche Respiratoire (J2R) - 9 et 10 Octobre 2015 - Dijon, France
- 2015 The Janus face of LL-37: both an inhibitor and a substrate of cysteine cathepsins
Pierre-Marie Andrault, Sergey A. Samsonov, Gunther Weber, Laurent Coquet, Kamran Nazmi, Jan G. M. Bolscher, Anne-Christine Lalmanach, Thierry Jouenne, Dieter Brömme, M. Teresa Pisabarro, Gilles Lalmanach & Fabien Lecaille
 *9th European Young Cystic Fibrosis Investigator Meeting - 18 au 20 Février 2015 - Paris, France
 *École franco-allemande de pneumologie - 24 au 27 Mars 2015 - Tegernsee, Allemagne
 *7^{ème} Colloque Protéolyse cellulaire - 28 au 30 Mai 2015 - Sète, France
- 2013 LL-37: un nouvel inhibiteur de la cathepsine L ?
Pierre-Marie Andrault, Gunther Weber Laurent Coquet, Thierry Jouenne, Sergey A. Samsonov, M. Teresa Pisabarro, Gilles Lalmanach & Fabien Lecaille
 26^{ème} Colloque Biotechnocentre – 10 et 11 Octobre 2014 – Seillac, France

Abréviations

AAT	α 1-antitrypsine
AP	<i>activator protein</i>
BM	<i>basement membrane</i>
BPCO	broncho-pneumopathie chronique obstructive
BPI	<i>bactericidal/permeability increasing protein</i>
CA-074	N-(L-3-trans-propylcarbomoyl-oxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline
CatG	cathepsine G
C4-S	chondroïtine-4 sulfate
CF	<i>cystic fibrosis</i>
CFTR	<i>cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CLIP	<i>class II-associated invariant chain peptide</i>
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CVF	capacité vitale forcée
DTT	dithiothréitol
DS	dermatane sulfate
E-64	1-N-(L-3-trans-carboxyoxirane-2-carbonyl) L-leucyl amino-4-guanidinobutane
GAG	glycosaminoglycane
HA	acide hyaluronique
HBD	<i>human β-defensin</i>
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
hCAP-18	<i>human cathelicidin antimicrobial peptide-18kDa</i>
HD	<i>human defensins</i>
HMWK	<i>high molecular weight kininogen</i>
HNE	<i>human neutrophil elastase</i>
HNP	<i>human neutrophil peptides</i>
HP	héparine
HS	héparane sulfate
HSPG	héparane sulfate protéoglycane
IFN- γ	interféron- γ
IL	interleukine
IRF	<i>IFN regulatory factor</i>
IUBMB	<i>International Union of Biochemistry and Molecular Biology</i>
JAK	<i>janus kinase</i>

LBA	liquide de lavage broncho-alvéolaire
LDL	<i>low-density lipoprotein</i>
LHVS	morpholinourea-leuciny-l-homophenylalanine-vinylsulfone-phenyl
LMWK	<i>low molecular weight kininogen</i>
MEC	matrice extracellulaire
MMPs	<i>matrix metalloproteases</i> , ou métalloprotéases matricielles
NAC	N-acétylcystéine
NFκB	<i>nuclear factor kappa B</i>
NSP 4	<i>neutrophil serine protease 4</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PBL	<i>proregion binding loop</i>
Pr3	<i>proteinase 3</i>
RANK	<i>receptor activator of NFκB</i>
RANKL	<i>receptor activator of NFκB ligand</i>
RNS	<i>reactive nitrogen sepcies</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>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TGF-β1	<i>transforming growth factor-β1</i>
TNF-α	<i>tumor necrosis factor-α</i>
VEMS	Volume expiratoire maximal à la première seconde

Introduction

L'unité INSERM UMR 1100 : « Pathologies respiratoires : protéolyse et aérosolthérapie » - Centre d'Étude des Pathologies Respiratoires dirigée par le Dr Mustapha Si-Tahar a pour objectif d'étudier les mécanismes protéolytiques et infectieux impliqués dans les pathologies pulmonaires inflammatoires de façon à mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques préventives et curatives notamment par aérosolthérapie. Les protéases sont des enzymes qui clivent les liaisons peptidiques des protéines et des peptides. Il existe six familles majeures de protéases classées en fonction de l'acide aminé impliqué dans le mécanisme catalytique : 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 se focalise sur le rôle et la régulation des cathepsines à cystéine humaines et de leurs inhibiteurs endogènes lors de pathologies inflammatoires pulmonaires et sur l'indentification de leurs substrats biologiques.

Il y a 11 cathepsines à cystéine exprimées chez l'Homme (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W et X), dont les principales sont les cathepsines B, H, L, K et S. Ce sont des protéases lysosomales exprimées de façon ubiquitaire dans de nombreux types cellulaires comme les macrophages, les ostéoclastes et les cellules épithéliales. Les cathepsines à cystéine sont actives à pH acide (5,5 – 6) et rapidement inactivées à pH neutre (à l'exception de la cathepsine S) et participent à la dégradation et au recyclage des protéines dans le compartiment lysosomal et endosomal. Plusieurs facteurs participent à la régulation de l'activité protéolytique des cathepsines comme la température, le pH, la force ionique, la prorégion de l'enzyme, le stress oxydatif, les glycosaminoglycanes et leurs inhibiteurs endogènes qui appartiennent à la superfamille des cystatines (stéfines, cystatines et kininogènes). Les cathepsines à cystéine peuvent également être localisées en dehors du compartiment lysosomal ou sécrétées dans le milieu extracellulaire où elles restent stables et actives sous certaines conditions. De ce fait, elles participent à des processus physiologiques plus spécifiques comme le renouvellement de la matrice extracellulaire et de la membrane basale, la maturation de précurseurs protéiques, la présentation antigénique par le CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe II ou encore l'apoptose. Cependant, suite à la perte du contrôle de leur activité extracellulaire, les cathepsines à cystéine peuvent jouer un rôle dans différents processus physiopathologiques comme l'ostéoporose, les arthrites rhumatoïdes et certains types de cancers (poumons, sein, pancréas) dans lesquels elles dégradent les protéines de la matrice extracellulaire comme l'élastine, les collagènes I et II et les protéines de la membrane basale comme le collagène IV, la fibronectine, les laminines ou encore les nidogènes-1 et -2. Les cathepsines à cystéine sont

également impliquées dans les pathologies inflammatoires pulmonaires comme la mucoviscidose, l'asthme, la broncho pneumopathie obstructive (BPCO), la silicose ou encore la fibrose.

L'inflammation pulmonaire est caractérisée par un recrutement important de cellules de l'immunité comme les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes T au niveau du tissu pulmonaire. Ces cellules vont sécréter des quantités massives de protéases comme les protéases à sérine de neutrophiles, les MMPs (*matrix metalloproteinases*) et les cathepsines à cystéine et contribuer au déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases en faveur de la protéolyse provoquant la dégradation du parenchyme pulmonaire. Ces phénomènes sont observés lors de pathologies pulmonaires comme la mucoviscidose et la BPCO. La mucoviscidose est une maladie autosomale récessive qui touche une naissance sur 2500 en Europe, les patients atteints de cette maladie ont une espérance de vie de 40 ans en moyenne. La mucoviscidose est liée à une mutation du gène qui code pour le canal CFTR (*cystic fibrosis transmembrane regulator*) qui assure le passage des ions Cl^- , HCO_3^- , et SCN^- . Le déficit fonctionnel du canal CFTR entraîne une déshydratation de l'épithélium bronchique et un épaissement du mucus qui aboutit à une diminution de la clairance muco-ciliaire et favorise ainsi la colonisation du poumon par des micro-organismes pathogènes tels que *P. aeruginosa* et *S. aureus*. La BPCO quant à elle est une pathologie pulmonaire en passe, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), de devenir la 3^{ème} cause de mortalité dans le monde d'ici 2020 et pour laquelle il n'existe pas de traitements curatifs à l'heure actuelle. La BPCO est principalement associée au tabagisme (90% des cas) et est caractérisée par une destruction progressive du tissu pulmonaire accompagnée d'une hypersécrétion de mucus et d'une obstruction des voies respiratoires. Les patients atteints de BPCO peuvent également souffrir d'une forme exacerbée de la maladie suite à l'infection pulmonaire par des bactéries (*H. influenzae*, *M. catarrhalis*) et des virus (rhinovirus). En plus du déséquilibre protéolytique, l'inflammation s'accompagne d'une augmentation du stress oxydatif liée à la sécrétion par les cellules de l'immunité d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (péroxyde d'hydrogène, peroxy-nitrites) et à la présence d'agents oxydants issus de la pollution atmosphérique (fumée de cigarette, ozone, nanoparticules). Les cathepsines à cystéine dont l'activité repose sur une fonction thiol (-SH) qui est sensible à l'oxydation, restent actives dans cet environnement oxydant. Il a été montré *in vitro* qu'il existe un état d'oxydation réversible de la cystéine du site actif : l'acide sulfénique (-SOH) pouvant expliquer la préservation de l'activité des cathepsines à cystéine en condition de stress

oxydatif (Godat *et al.*, 2008). D'autre part, les systèmes antioxydants tels que la catalase contribueraient également à protéger les cathepsines à cystéine contre l'oxydation (Hervé-Grépinet *et al.*, 2008). Outre la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire, les cathepsines à cystéine contribuent également à la diminution des défenses antimicrobiennes pulmonaires liée à l'inflammation en clivant certains peptides et protéines antimicrobiens.

Le tissu pulmonaire possède plusieurs moyens de défense contre les micro-organismes pathogènes comme la sécrétion de mucus associée à la clairance muco-ciliaire et également la production de peptides et protéines à activité antimicrobienne (PAMs). Les PAMs pulmonaires comprennent des peptides cationiques d'un poids moléculaire compris entre 3 et 5 kDa structurés en feuillets- β comme les α - et les β -défensines, ou en hélice- α comme la cathélicidine LL-37 et également des protéines telles que le lysozyme, la lactoferrine, le SLPI (*secretory leucocyte peptidase inhibitor*) et les protéines du surfactant SP-A et SP-D. Les PAMs pulmonaires agissent directement sur les micro-organismes pathogènes comme les bactéries, les cellules fongiques et les virus et participent également à la régulation de la réponse immunitaire en modulant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ainsi que le chimiotactisme. Lors de pathologies inflammatoires pulmonaires, le déséquilibre protéolytique en faveur de la protéolyse entraîne le clivage et l'inactivation des PAMs, les cathepsines à cystéine participent à ce phénomène aux côtés des protéases à sérine et des MMPs. Il a notamment été montré que lors de pathologies comme la mucoviscidose ou l'emphysème pulmonaire, les cathepsines B, L et S clivent et inactivent certains PAMs pulmonaires comme le SLPI, la lactoferrine, les β -défensines-2 et -3 et la protéine du surfactant SP-A (Taggart *et al.*, 2001; Taggart *et al.*, 2003; Rogan *et al.*, 2004; Lecaille *et al.*, 2013). Cependant, aucune étude n'a encore montré l'implication des cathepsines à cystéine dans la dégradation de la cathélicidine LL-37 qui est un PAM important dans l'immunité innée pulmonaire et qui peut être clivé et inactivé par des protéases comme l'HNE (*human neutrophil elastase*) et la cathepsine D (protéase acide) lors de la mucoviscidose (Bergsson *et al.*, 2009).

Dans ce contexte, mes travaux de thèse ont consisté à caractériser la capacité des cathepsines à cystéine humaines à dégrader la cathélicidine LL-37 lors de pathologies inflammatoires pulmonaires telles que la mucoviscidose et la BPCO.

I- Revue bibliographique

1. Les cathepsines à cystéine humaines

Les protéases sont des enzymes capables de dégrader des substrats de nature protéique par clivage des liaisons peptidiques. La classification des protéases se fait en fonction de la nature du résidu essentiel à leur fonction catalytique. Ainsi il est possible de distinguer 6 classes de protéases : les protéases à sérine, les protéases à cystéine, les protéases acides (à aspartate et à glutamate), les métalloprotéases et les protéases à thréonine (López-Otín & Bond, 2008). Les protéases à cystéine sont largement exprimées dans de nombreux organismes vivants, aussi bien au sein du règne animal et du règne végétal que chez les virus et les bactéries (Rawlings & Barrett, 1994). Parmi les 64 familles de protéases à cystéine (<http://merops.sanger.ac.uk>), la plus représentée est celle de la papaïne (clan CA, famille C1), dont le nom est issu de l'enzyme extraite du latex du papayer.

Chez l'homme il existe 11 protéases à cystéine appelées cathepsines à cystéine : les cathepsines B, C, F, H, K, L, O, S, V, W et X. Le terme « cathepsine » est aussi utilisé pour désigner certaines protéases acides (cathepsines D et E), et certaines protéases à sérine (cathepsine G). Ainsi, pour éviter toute ambiguïté, le terme « cathepsines à cystéine » est systématiquement utilisé. Sur le plan étymologique, le terme « cathepsine » vient du grec *kathepsin* qui signifie « digérer, se réduire ». Ce terme a été utilisé pour la première fois en 1929 suite à la découverte de protéases extraites de muqueuses gastriques, différentes des pepsines et actives à pH acide (Willstätter & Bamann, 1929). La première cathepsine à cystéine caractérisée fut la cathepsine C en 1948 (Gutmann & Fruton, 1948). Après cette première découverte, d'autres cathepsines à cystéine ont été caractérisées jusqu'aux années 1990, notamment les cathepsines B (B pour *Bovine spleen*), L (L pour *rat Liver*), H et S (Greenbaum & Fruton, 1957; Turnsek *et al.*, 1975; Kirschke *et al.*, 1976). Jusqu'à cette période, les cathepsines à cystéine étaient principalement décrites comme des protéases lysosomales exprimées de façon ubiquitaire, actives à pH acide (5,5 – 6) et inactivées à pH neutre (à l'exception de la cathepsine S). Elles étaient considérées comme de simples « protéases de ménage », majoritairement impliquées dans la dégradation et le recyclage endosomal et lysosomal des protéines. Cependant, depuis les vingt dernières années, l'évolution des techniques de biologie moléculaire et la connaissance du génome humain ont permis de mettre en évidence d'autres cathepsines à cystéine : les cathepsines F, K, O, V, X et W, la cathepsine X étant la dernière à avoir été découverte par Nägler et ses collaborateurs

(Nägler *et al.*, 1999). De plus, des études de Northern Blot et d'immunohistochimie ont montré que certaines cathepsines ont une expression et une localisation plus spécifique. La cathepsine K est principalement exprimée par les ostéoclastes (Chapman *et al.*, 1997). La cathepsine V est exprimée quant à elle au niveau du thymus et des testicules (Brömme *et al.*, 1999). La cathepsine X est majoritairement présente dans les cellules immunitaires telles que les cellules dendritiques et les macrophages (Kos *et al.*, 2005) et la cathepsine W (aussi appelée lymphopaïne) est principalement exprimée par les lymphocytes T cytotoxiques et les cellules NK (*natural killer*) (Stoeckle *et al.*, 2009). Enfin la cathepsine S, qui est retrouvée en grande quantité dans la rate (S pour *Spleen*), est présente dans les cellules présentatrices d'antigène (cellules dendritiques, macrophages) et dans les cellules musculaires lisses (Shi *et al.*, 1994; Schwarz *et al.*, 2002).

Outre la découverte de l'expression localisée de certaines cathepsines à cystéine, d'autres études ont montré que les cathepsines à cystéine sont localisées sous forme active dans d'autres compartiments subcellulaires (cytoplasme, noyau), ou sécrétées dans le milieu extracellulaire. Ainsi les cathepsines à cystéine participent au renouvellement de la matrice osseuse et de la matrice extracellulaire, à la présentation de peptides antigéniques par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type II, ou encore à la maturation de pro-hormones peptidiques (Vasiljeva *et al.*, 2007; Kasabova *et al.*, 2011). Cependant elles sont impliquées dans des processus pathologiques tels que l'arthrite rhumatoïde, l'ostéoporose, l'invasion tumorale, l'asthme et les phénomènes inflammatoires. De ce fait, les rôles cruciaux qu'occupent les cathepsines à cystéine dans diverses pathologies suscitent l'intérêt de la communauté scientifique et celui des entreprises pharmaceutiques qui considèrent certaines d'entre elles comme des cibles thérapeutiques pertinentes.

1.1. Généralités

1.1.1. Classification et phylogénie

La classification des protéases peut se faire selon deux nomenclatures distinctes. La nomenclature numérique de l'« *Enzyme Commission* » (EC) et une autre nomenclature plus récente proposée par Rawlings et Barrett (Rawlings *et al.*, 2004) qui consiste à classer les protéases en clans et familles.

1.1.1.1. L' « Enzyme Commission »

Cette classification numérique des enzymes a été 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*, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>). Elle est basée sur la nature de la réaction catalysée et sur le type de substrat impliqué dans la catalyse. Ainsi les protéases font partie des hydrolases (classe EC 3) et plus précisément de la sous-classe des peptidases (EC 3.4). La sous-classe des peptidases est elle-même composée de 14 sous-sous-classes selon la localisation du site de clivage et la nature du mécanisme catalytique. De façon générale, il est possible de distinguer trois types de peptidases : les endopeptidases (EC 3.4.21 à EC 3.4.99) qui clivent à l'intérieur de la chaîne polypeptidique, générant ainsi des fragments de longueur variable; les exopeptidases (EC 3.4.11 à EC 3.4.19) qui peuvent cliver du côté N-terminal (aminopeptidases) ou C-terminal (carboxypeptidases) de la chaîne polypeptidique, et libèrent de cette façon des acides aminés libres, des dipeptides ou des tripeptides. La majorité des cathepsines à cystéine sont des endopeptidases (EC 3.4.22). Cependant certaines d'entre elles sont des exopeptidases et sont donc classées dans d'autres groupes. C'est le cas notamment de la cathepsine C qui est une aminopeptidase (EC 3.4.14) et de la cathepsine X qui est une carboxypeptidase (EC 3.4.18).

1.1.1.2. Classification en clan et famille

La classification selon l'EC est encore beaucoup utilisée dans les bases de données, cependant elle ne permet pas de comprendre l'évolution phylogénétique et fonctionnelle des enzymes. C'est pourquoi, dans le cas des protéases, Rawlings et collaborateurs ont mis en place en 2004 une nouvelle nomenclature en clan et famille (Rawlings *et al.*, 2004). Cette nouvelle classification permet de regrouper les enzymes en fonction de leur évolution à partir d'un ancêtre commun, elle est notamment utilisée dans la base de données des protéases : MEROPS database (<http://merops.sanger.ac.uk/>). Une famille désigne un groupe d'enzymes dans lequel chaque membre a une relation d'évolution significative sur le plan statistique avec au moins un autre membre. La relation est établie soit sur la séquence entière de l'enzyme, soit sur une partie de la séquence responsable de l'activité catalytique de l'enzyme (Rawlings & Barrett, 1993). Un clan rassemble un groupe de familles ayant évolué à partir d'un ancêtre commun mais dont l'origine commune ne peut être établie par comparaison des séquences. La

classification est donc plutôt basée sur la comparaison entre les structures tridimensionnelles, ou sur l'ordre des résidus qui composent le site catalytique.

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

Les protéases à cystéine sont divisées en 10 clans différents (clans CA, CD, CE, CF, CL, CM, CN, CO, CP et CQ) regroupant 64 familles et un total de 91 sous-familles (<http://merops.sanger.ac.uk/>). La famille comptant le plus grand nombre de membres identifiés par homologie de séquence est la famille de la papaïne (famille C1, clan CA). A l'origine, les protéases de type cathepsine (B et L), bléomycine hydrolase et calpaïne étaient regroupées dans la « super-famille de la papaïne » (Berti & Storer, 1995). Suite à des études phylogénétiques plus approfondies basées sur la structure tridimensionnelle, cette super-famille a pu être divisée en trois groupes distincts : les protéases de type cathepsine et papaïne (famille C1a), les protéases de type bléomycine hydrolase (famille C1b) et celles du type calpaïne (famille C2).

Concernant les cathepsines à cystéine humaines, il existe deux groupes principaux qui se distinguent par la présence de motifs caractéristiques dans la séquence de leur pro-région (Karrer *et al.*, 1993; Berti & Storer, 1995). Le premier groupe est celui des cathepsines apparentées à la cathepsine L (*L-like*) qui possèdent une pro-région d'une centaine de résidus comprenant deux motifs conservés : ERF(X)NIN et GxNxFx_D. Ce groupe compte notamment les cathepsines L, K, S, H et V. Le second groupe est celui des cathepsines apparentées à la cathepsine B (*B-like*), dont la pro-région fait une longueur d'environ une soixantaine de résidus et un seul motif conservé : GxNxFx. Ce groupe comprend les cathepsines B, C, O et X. Les cathepsines F et W sont classées dans un autre groupe parce qu'elles possèdent au niveau de leur pro-région un motif conservé différent : ERFNAQ (Wex *et al.*, 1999).

1.1.2. Structure

Les cathepsines à cystéine sont synthétisées sous forme de pré-proenzymes inactives (zymogènes) d'environ 50 kDa qui sont clivées et relarguées pour générer la forme active (**Tableau 1**). La pré-région (environ 15 à 20 résidus) correspond au peptide signal qui sera clivé après adressage du zymogène au réticulum endoplasmique. La prorégion assure le bon repliement et la stabilité de l'enzyme contre la dénaturation à pH neutre ou légèrement alcalin (Tao *et al.*, 1994). Elle permet également d'inhiber réversiblement le domaine catalytique,

évitant ainsi une maturation trop précoce (Cygler & Mort, 1997). La forme mature est obtenue après le clivage et le relargage de ce propeptide.

Tableau 1 : Caractéristiques des cathepsines à cystéine humaines

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

Nom	N° AC	Peptide signal (AA)	Prodomaine			Domaine mature			Proforme		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

1.1.2.1. La prorégion

Les prorégions des cathepsines de type B, L ou F présentent très peu d'homologie de séquences mais possèdent des similarités au niveau de leur repliement dans l'espace (Cygler & Mort, 1997). La prorégion de la cathepsine L est constituée de deux parties distinctes. La partie N-terminale, d'une longueur d'environ 60 résidus, constitue un « mini-domaine » compact comportant deux hélices α et un feuillet β situé le long de la seconde hélice (**Figure 1**). Ce domaine est situé à proximité d'une boucle appelée BPL (pour *Proregion Binding Loop*) localisée à l'entrée du site catalytique et qui permet de stabiliser le positionnement de la prorégion. La partie C-terminale de la prorégion s'étend à la surface de l'enzyme et comporte une courte hélice α qui masque le site actif et empêche ainsi l'accès à des substrats peptidiques. La prorégion de la cathepsine B possède une partie C-terminale apparentée à celle de la cathepsine L. En revanche, son domaine N-terminal est plus court (environ 30 résidus) et n'est formé que d'une hélice α et d'un feuillet β . Cette différence structurale s'explique par la présence d'une boucle d'occlusion qui, en position ouverte, occupe la place de la première hélice α . La prorégion de la cathepsine X (cathepsine de type B) est plus courte

(40 résidus environ) et ne comporte aucune structure secondaire. De plus, la cathepsine X est la seule cathepsine à cystéine dont la prorégion forme une liaison covalente avec la cystéine du site actif (Sivaraman *et al.*, 2000).

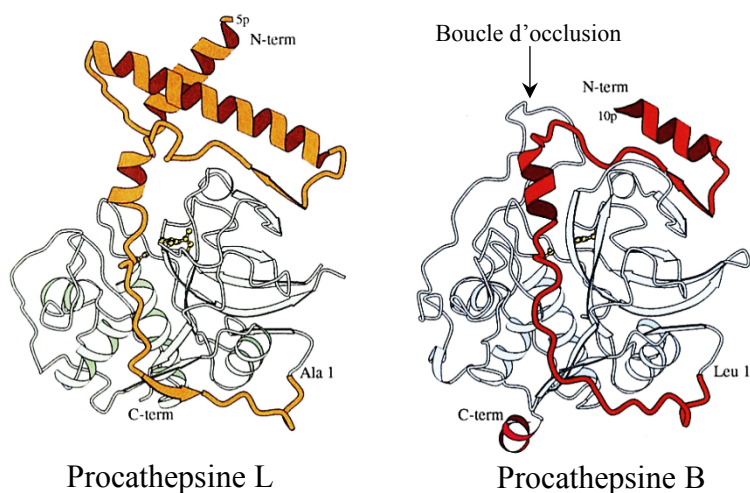


Figure 1 : Structures tridimensionnelles des procathépsines B et L

Les formes matures sont représentées en gris clair et le site actif est représenté en jaune. Le propeptide de la cathepsine L est représenté en orange et celui de la cathepsine B en rouge. (illustration extraite de Coulombe *et al.*, 1996)

De manière générale, la prorégion se positionne de façon inversée dans le site actif par rapport à la position naturelle d'un substrat protéique, ce qui lui permet de résister à un clivage éventuel (Cygler & Mort, 1997). De plus, il s'avère que la prorégion est aussi un inhibiteur sélectif et réversible de l'enzyme parente (Cygler & Mort, 1997; Guay *et al.*, 2000). Le propeptide de la cathepsine B par exemple, est un bon inhibiteur de la cathepsine B mature ($K_i = 0,4 \text{ nM}$) et inhibe faiblement la cathepsine L (K_i de l'ordre du micromolaire) (Fox *et al.*, 1992). De façon similaire, la cathepsine L est inhibée sélectivement par son propeptide ($K_i = 0,088 \text{ nM}$) (Carmona *et al.*, 1996). De façon intéressante, des inhibiteurs sélectifs et réversibles de la cathepsine L ont été développés à partir de la séquence MNGFQ, qui correspond à la séquence de la prorégion insérée dans le site actif de l'enzyme (Chowdhury *et al.*, 2002)

1.1.2.2. Maturation du proenzyme

La maturation intra-lysosomale des cathepsines à cystéine peut s'effectuer sous l'action de protéases acide (pepsine, cathepsine D), de protéases à cystéine (légumaïne) et d'autres protéases présentes dans le lysosome (Nishimura *et al.*, 1988; Rowan *et al.*, 1992). Cependant les cathepsines à cystéine à activité endopeptidasique sont également capables de s'auto-activer à pH acide, soit par un mécanisme intermoléculaire durant lequel une cathepsine

activée va procéder à la maturation des autres procathepsines environnantes (Mach *et al.*, 1994) ; soit par un mécanisme intramoléculaire durant lequel cette fois-ci l'acidité du milieu va modifier la conformation du propeptide (qui passe en conformation relâchée) et perturber les interactions électrostatiques entre la prorégion et l'enzyme, permettant ainsi à l'enzyme de s'auto-activer (McQueney *et al.*, 1997). Le processus de maturation peut être accéléré en présence de molécules chargées négativement comme les glycosaminoglycanes (GAGs) qui, à de faibles concentrations, peuvent accélérer la maturation des cathepsines B, K, L et S (Mason & Massey, 1992; Ishidoh & Kominami, 1994; Vasiljeva *et al.*, 2005; Lemaire *et al.*, 2014). Dans le cas de la procathepsine B, le chondroïtine sulfate et l'héparine interagissent avec la prorégion et modifient les interactions électrostatiques entre le propeptide et le site catalytique (Caglic *et al.*, 2007). L'interaction avec les GAGs va modifier la conformation de la prorégion, qui ne va plus masquer le site actif, et permettre à la cathepsine B de cliver et libérer son propeptide. Les exopeptidases comme les cathepsines C et X sont incapables de s'auto-activer et nécessitent la présence d'autres protéases, y compris les cathepsines à cystéine, pour effectuer leur maturation (Nägler *et al.*, 1999; Dahl *et al.*, 2001). Les cathepsines à cystéine matures peuvent être constituées d'une seule chaîne comme les cathepsines K et S par exemple, ou de deux chaînes : une chaîne lourde (~ 25 kDa) et une chaîne légère (~ 5 kDa) pour les cathepsines B et L.

1.1.2.3. Forme mature des cathepsines

La forme mature des cathepsines à cystéine est monomérique, exceptée pour la cathepsine C qui est un tétramère de 200 kDa. Le poids moléculaire des cathepsines à cystéine matures se situe entre 20 et 30 kDa (**Tableau 1**). Leur structure est composée de deux domaines de taille comparable : le domaine gauche ou L (pour *Left*) et le domaine droit ou R (pour *Right*) (**Figure 2**). Le domaine L se situe du côté N-terminal de la chaîne polypeptidique et comporte trois hélices α stabilisées par deux ponts disulfures, dont la plus longue (40 résidus environ), porte la cystéine du site catalytique (Cys25) (McGrath, 1999). Le domaine R, situé du côté C-terminal, comporte 5 à 6 feuillets β qui forment une structure appelée tonneau β qui est stabilisé par un pont disulfure. Les deux domaines L et R forment une cavité en forme de « V » dans laquelle se situent les résidus du site actif essentiels à l'activité protéolytique : la cystéine 25 (domaine L), l'histidine 159 et l'asparagine 175 (domaine R), selon la numérotation de la papaïne (McGrath, 1999) (*nb : cette numérotation sera utilisée tout au long de la revue bibliographique*). En plus de la structure générale commune à l'ensemble des

cathepsines à cystéine, les cathepsines B et X disposent d'une structure supplémentaire appelée boucle d'occlusion (Musil *et al.*, 1991; Nägler *et al.*, 1999).

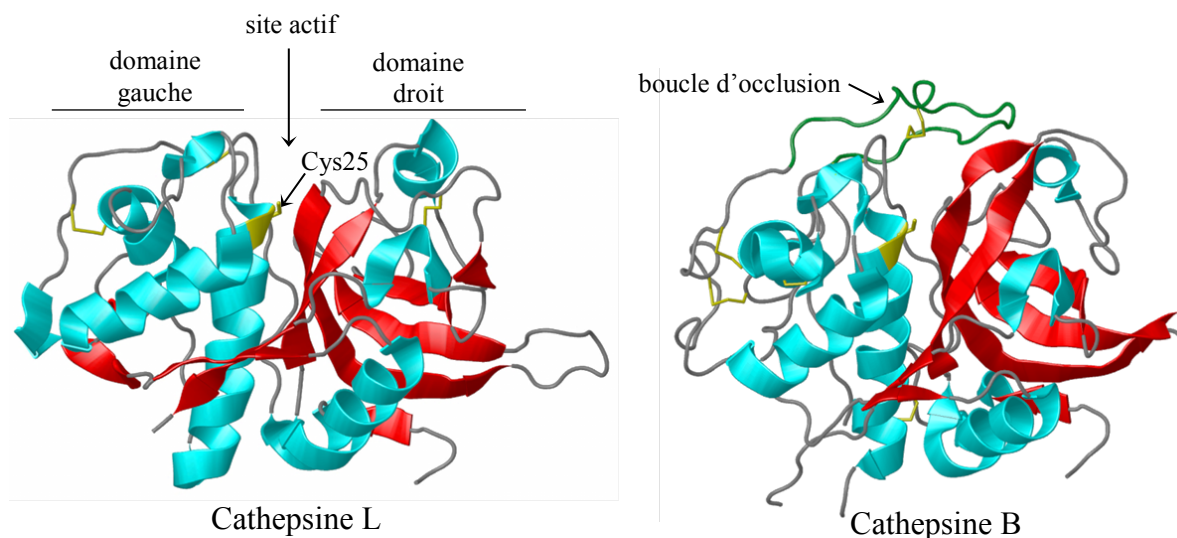


Figure 2 : Structures tridimensionnelles des cathepsines B et L

Les hélices alpha sont en cyan, les feuillets beta sont en rouge et les parties non structurées sont en gris. La cystéine du domaine catalytique est représentée en jaune et la boucle d'occlusion de la cathepsine B est représentée en vert. La modélisation a été réalisée sous Jmol (www.jmol.org), à l'aide des structures PDB de la cathepsine L (pdb 2xu3) et de la cathepsine B (pdb 1huc).

1.1.3. Fonctionnement et organisation du site catalytique

1.1.3.1. Mécanisme catalytique

Le mécanisme catalytique des protéases à cystéine requiert la présence de la cystéine 25 (Cys25) qui doit être réduite (thiolate : S^-) de façon à former une paire ionique thiolate/imidazolium ($Cys-S^-/His-ImH^+$) avec l'histidine 159 (His159) adjacente (**Figure 3**). La valeur du point isoélectrique de la cystéine est de 7, l'His159 permet donc de maintenir le thiol de la Cys25 sous forme déprotonée à pH acide. Le bon positionnement de His159 est maintenu par l'asparagine 175 (Asn175) via une liaison hydrogène (Storer & Ménard, 1994). Ainsi, ces trois résidus forment la triade catalytique des protéases à cystéine. La première étape du mécanisme catalytique est l'attaque nucléophile du thiolate de la Cys25 sur le groupement carbonyle de la liaison peptidique à cliver (A). Il va alors avoir formation d'un intermédiaire tétraédrique appelé oxyanion (B) stabilisé par la formation de liaisons hydrogènes avec la Cys25 et la Gln19. Cet oxyanion se dissocie lorsque la partie amine du substrat récupère le proton de l'imidazolium (C). L'imidazolium va ensuite perdre son proton, libérant ainsi la partie amine du substrat. Cette étape est suivie de l'attaque nucléophile d'une molécule d'eau sur la partie carbonyle du substrat, formant ainsi un nouvel intermédiaire

tétraédrique : l'acyl-enzyme (D, E). Enfin, par une étape de déacylation, la partie carbonyle du substrat est libérée et l'enzyme redevient libre (F) (Storer & Ménard, 1994; Rzychon *et al.*, 2004).

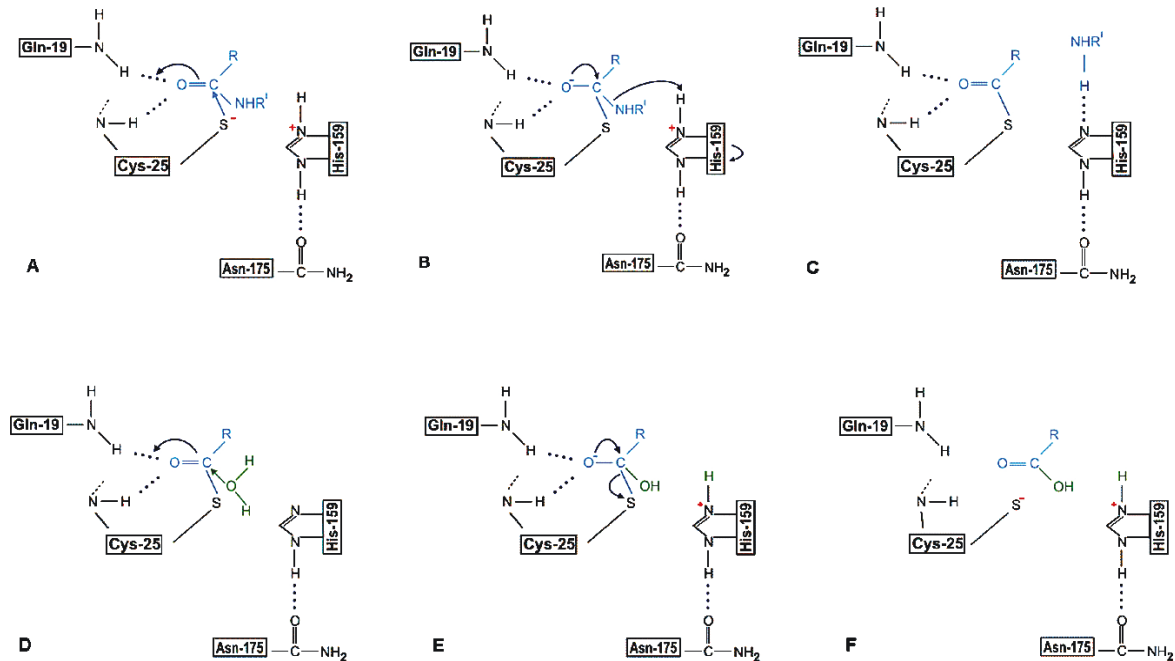


Figure 3 : Mécanisme catalytique des protéases à cystéine
(illustration extraite de Rzychon *et al.*, 2004)

1.1.3.2. Le site de liaison au substrat

Le mode d'interaction entre le site actif des protéases et leur substrat est décrit par la nomenclature de Schechter et Berger (Schechter & Berger, 1967). Cette nomenclature a pour principe de diviser le site de liaison au substrat de l'enzyme en plusieurs sous-sites (notés S et S'), qui interagissent chacun avec un seul résidu du substrat (notés P et P'). En amont du site de clivage (partie N-terminale du substrat), les sous-sites sont numérotés S1, S2, Sn... et S1', S2', Sn' en aval (partie C-terminale du substrat). Les résidus du substrat se notent Pn et sont numérotés selon le même principe (**Figure 4**).

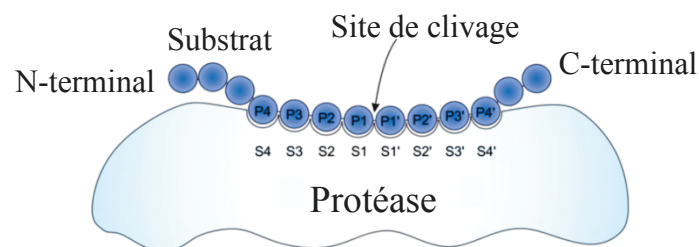


Figure 4 : Nomenclature de Schechter et Berger
(d'après Fonović & Turk, 2014)

Des études cristallographiques sur des complexes cathepsines/inhibiteurs analogues de substrat ont montré que le substrat se positionne dans une conformation étendue le long de la cavité formée par le site actif et interagit de façon alternée avec les domaines R et L (**Figure 5**). Le positionnement des sous-sites S1, S2 et S1' ne diffèrent pas d'une cathepsine à l'autre (Turk & Guncar, 2003). Au sein de ces sites, la glycine 66, la glutamine 29 et le tryptophane 177 sont des résidus conservés qui interagissent avec le substrat et assurent son bon positionnement dans le site actif.

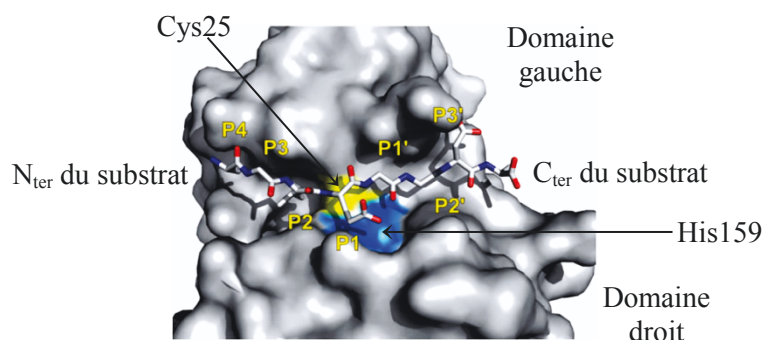


Figure 5 : Représentation par modélisation informatique de l'interaction entre le site actif de la cathepsine K et un substrat peptidique

La cathepsine K est représentée en potentiel de surface (en gris), le substrat peptidique représenté en bâtons est l'octapeptide N_{ter}-Ala-Gly-Leu-Gly-Gly-Asp-Ala-C_{ter} (les carbones sont en blanc, les azotes en bleu et les oxygènes en rouge) (d'après Novinec & Lenarčič, 2013).

1.1.4. Spécificité enzymatique des cathepsines à cystéine

La spécificité enzymatique des protéases est régie par la nature des résidus qui composent les sous-sites S et S' qui interagissent avec les résidus P et P' du substrat. Dans le cas des cathepsines, le sous-site S2 est le seul à former une « poche » bien définie, composée de résidus des domaines L et R (McGrath, 1999). La spécificité enzymatique des cathepsines est majoritairement déterminée par l'interaction entre le sous-site S2 et le résidu P2 du substrat. La poche S2 est hydrophobe pour la plupart des cathepsines et elle présente une bonne affinité pour la phénylalanine et la leucine (**Tableau 2**). L'utilisation de banques combinatoires de substrats fluorogéniques et l'élaboration par mutagenèse dirigée de mutants des cathepsines au niveau du site actif a permis de caractériser ces différences de spécificité enzymatique (Choe *et al.*, 2006). La cathepsine B présente la particularité d'accepter des résidus basiques en S2 tel que l'arginine par exemple, à cause de la présence au niveau de la poche S2 d'un acide glutamique en position 205 (Glu205) (Barrett & Kirschke, 1981). En ce qui concerne la cathepsine K, elle accepte en S2 des petits résidus hydrophobes comme la proline ou la leucine grâce aux résidus Tyr67 et Leu205 présents dans la poche S2 (Lecaille *et al.*, 2002a; Lecaille *et al.*, 2007). Le sous-site S1 a une spécificité moins bien caractérisée que le S2, il est

moins sélectif et accepte de préférence des résidus basiques tels que l'arginine ou la lysine (Brocklehurst *et al.*, 1987; Kirschke *et al.*, 1995). Pour le site S3, il ne semblerait pas y avoir de spécificité associée aux résidus qui le composent, ces derniers n'étant pas conservés chez les cathepsines (Turk *et al.*, 1998). La spécificité des autres sous-sites, en particulier les sous-sites S', est peu définie, exceptée pour le S'2 qui montre une préférence pour le tryptophane.

Tableau 2: Résidus constituant la poche S2 des différentes cathepsines

Enzymes	Position des résidus en S2					
	67	68	133	157	160	205
Papaïne	Tyr	Pro	Val	Val	Ala	Ser
Cathepsine B	Tyr	Pro	Ala	Gly	Ala	Glu
Cathepsine L	Leu	Met	Ala	Met	Gly	Ala
Cathepsine K	Tyr	Met	Ala	Leu	Ala	Leu
Cathepsine S	Phe	Met	Gly	Val	Gly	Phe

1.1.5. Particularité des exopeptidases

Les cathepsines à cystéine possèdent pour la plupart une activité endopeptidasique, mais certaines d'entre elles présentent également une activité exopeptidasique (cathepsines B, C, H et X). Cette particularité s'explique par la présence chez ces cathepsines de structures supplémentaires qui vont limiter l'accessibilité au site actif ainsi que le nombre de sites de fixation au substrat (**Figure 6**). Ces éléments structuraux vont empêcher la fixation de substrats longs, et permettre l'ancrage de la partie N-terminale (pour les aminopeptidases) ou C-terminale du substrat (pour les carboxypeptidases) par l'intermédiaire d'interactions électrostatiques sélectives (Turk *et al.*, 2003).

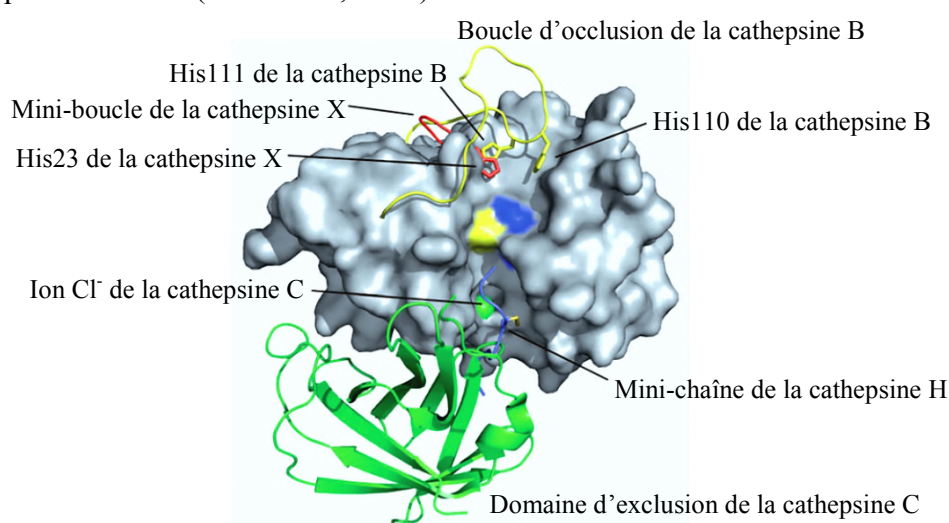


Figure 6 : Caractéristiques structurales des cathepsines à cystéine à activité exopeptidasique
Superposition du domaine catalytique de la cathepsine L (gris) avec les exodomains des cathepsines X (rouge), B (jaune), C (vert) et H (bleu). (illustration extraite de Novinec & Lenarčič, 2013)

Dans le cas de la cathepsine B, l'élément structural supplémentaire d'une longueur de 18 résidus s'appelle la « boucle d'occlusion ». La boucle d'occlusion va bloquer l'accès aux sous-sites S'3 et S'4 du site actif, de plus, elle comporte deux résidus histidines chargés positivement : His110 et His111, qui vont permettre l'ancrage du groupement carbonyle C-terminal du substrat. L'ensemble de ces caractéristiques confère à la cathepsine B son activité dipeptidyl-carboxypeptidasique (Turk *et al.*, 2003). La délétion de cette boucle par mutagenèse dirigée provoque une augmentation significative de l'activité endopeptidasique de la cathepsine B mutée (Nägler *et al.*, 1997). Chez l'enzyme sauvage, le recouvrement de l'activité endopeptidasique est lié à la mobilité de la boucle d'occlusion qui peut libérer l'accès au site actif (Illy *et al.*, 1997; Podobnik *et al.*, 1997; Nägler *et al.*, 1997). Par analogie avec la cathepsine B, la cathepsine X possède quant à elle une « mini-boucle » de 3 résidus et qui comporte une seule histidine (His23) (Nägler *et al.*, 1999). Cette mini-boucle empêche l'accès aux sous-site S'2 à S'4 du site actif, ce qui donne à la cathepsine X son activité mono-carboxypeptidasique (Turk *et al.*, 2003). A l'inverse, les cathepsines C (dont le mécanisme catalytique requiert un ion Cl⁻) et H sont des aminopeptidases et possèdent sur leurs exodomains des groupements chargés négativement qui vont ancrer la partie N-terminale du substrat chargé positivement. Pour la cathepsine H, il s'agit d'une partie du propeptide constituée de 8 résidus, qui va rester attachée au site catalytique et former une « mini-chaîne » (Guncar *et al.*, 1998), tandis que pour la cathepsine C, il s'agit d'une structure unique chez les cathepsines appelée le domaine d'exclusion, qui permet aussi à l'enzyme de s'associer en tétramère (Turk *et al.*, 2001).

1.1.6. Localisation cellulaire des cathepsines à cystéine

1.1.6.1. Voie d'adressage vers le lysosome

Les cathepsines à cystéine sont synthétisées sous forme de zymogène (ou préproenzyme) inactif au niveau du réticulum endoplasmique (RE) rugueux (**Figure 7**). Le peptide signal contenu dans la prérégion va permettre l'adressage à la lumière du RE et sera ensuite clivé par les « signal peptidases » (pour revue : Reiser *et al.*, 2010). Au sein du RE, les pro-cathepsines vont se replier et former leurs ponts disulfures. Après repliement correct, elles vont subir une N-glycosylation sur les résidus asparagine puis vont être transportées jusqu'à l'appareil de Golgi (voie A) où les chaînes glycosylées vont être phosphorylées pour générer un motif mannose-6-phosphate. C'est ce mannose-6-phosphate qui va permettre l'adressage de la

proforme vers les endosomes/lysosomes tardifs (voies B et C) où elle sera maturée (décrit précédemment, chapitre 1.1.2.2).

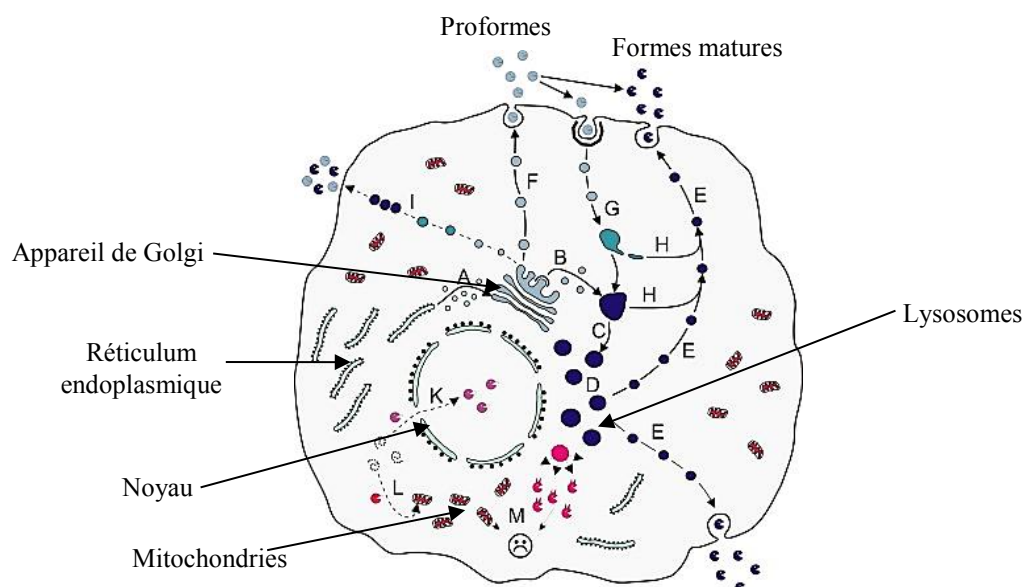


Figure 7: Voies d'adressage et localisation cellulaire des cathepsines à cystéine.
(illustration extraite de Brix *et al.*, 2008)

1.1.6.2. Voies alternatives d'adressage

Les cathepsines sont majoritairement localisées dans le compartiment endosomal/lysosomal, mais dans certains types cellulaires comme les thyrocytes ou les kératinocytes, elles peuvent être sécrétées par exocytose dans le milieu extracellulaire (voies E/F), sous forme mature ou de proforme (Linke *et al.*, 2002; Büth *et al.*, 2004). Les cellules tumorales sont aussi capables de sécréter la cathepsine B, favorisant ainsi le processus de migration des cellules tumorales (Rozhin *et al.*, 1994). En plus d'être sécrétées, les cathepsines peuvent s'associer à la membrane plasmique des cellules. Il a été montré sur certains types de cellules cancéreuses (colon, sein, peau) que la cathepsine B est localisée au niveau des radeaux lipidiques membranaires, plus précisément au niveau des cavéoles, où elle interagit avec l'annexine II qui peut induire la cascade protéolytique responsable de la migration des cellules cancéreuses (pour revue : Aggarwal & Sloane, 2014). La procathepsine X sécrétée peut également interagir avec la membrane des cellules endothéliales via une séquence RGD de liaison aux intégrines et localisée au niveau de sa prorégion (Lechner *et al.*, 2006). Dans certains types cellulaires comme les macrophages et les fibroblastes, les procathepsines ne possèdent pas le récepteur mannose-6-phosphate, ce qui aboutit à une sécrétion constitutive de proformes (voie F) (pour revue : Brix *et al.*, 2008). Les proformes sécrétées peuvent être ré-internalisées (voie G), pour être maturées avant d'être à nouveau sécrétées par les voies classiques (voie H). Il

existe des formes de cathepsines, générées par épissage alternatif, qui ne possèdent pas de peptide signal et peuvent ainsi se retrouver dans des compartiments inhabituels comme le noyau (voie K) ou les mitochondries (voie L). Elles vont exercer dans ces compartiments des fonctions plus spécifiques comme l'initiation de l'apoptose ou la régulation du cycle cellulaire. La cathepsine L par exemple, peut être localisée sous forme mature dans le noyau où elle active le facteur de transcription CDP/Cux, favorisant la transition de la phase G1 vers la phase S du cycle cellulaire (Goulet *et al.*, 2004). L'activité protéolytique de la cathepsine L dans le noyau est régulée par un inhibiteur endogène des cathepsines à cystéine : la stéfine B (Ceru *et al.*, 2010). Il a également été montré chez la souris que la cathepsine L peut réguler le contrôle du cycle cellulaire en clivant la partie N-terminale de l'histone H3 (Duncan *et al.*, 2008; Adams-Cioaba *et al.*, 2011). Enfin, durant certains processus pathologiques, les lysosomes peuvent sécréter des cathepsines actives dans le cytoplasme (voie M) où elles pourraient être impliquées dans la mort programmée des cellules.

1.1.6.3. Les lysosomes sécrétoires

Dans la plupart des cas, les cellules stockent leurs produits de sécrétion dans des compartiments particuliers appelés granules de sécrétion. Ces granules sont capables de fusionner avec la membrane plasmique pour libérer leur contenu dans le milieu extracellulaire. En plus des lysosomes conventionnels, certaines cellules comme les macrophages, les cellules NK ou encore les mastocytes, possèdent des lysosomes qui fonctionnent comme des compartiments sécrétoires : les lysosomes sécrétoires (Stinchcombe & Griffiths, 1999). Les lysosomes sécrétoires permettent ainsi aux cellules NK et aux mastocytes de relarguer la cathepsine C, et aux macrophages de sécréter les cathepsines B, L, S et K (Reddy *et al.*, 1995; Wolters *et al.*, 1998; Punturieri *et al.*, 2000).

1.2. Régulation des cathepsines à cystéine

La demi-vie des cathepsines peut varier de quelques minutes à plusieurs heures en fonction de la cathepsine concernée et de son environnement cellulaire (Nissler *et al.*, 1999; Katunuma, 2010). En plus de leur régulation au niveau transcriptionnel, les cathepsines peuvent être régulées de façon réversible ou irréversible par divers facteurs environnementaux tels que le pH, la température, la présence de glycosaminoglycanes (GAGs), d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote ou de leurs inhibiteurs endogènes.

1.2.1. Régulation transcriptionnelle

La structure du promoteur du gène de la cathepsine B, dont l'expression est ubiquitaire, est caractéristique de la structure d'un promoteur de gène de « ménage » exprimé de façon constitutive, c'est-à-dire riche en séquences GC (Gong *et al.*, 1993). À l'inverse, les promoteurs des gènes des cathepsines K et S ont un contenu plus faible en séquences GC et comportent également de nombreux sites de liaison aux facteurs de transcription, ce qui est caractéristique des promoteurs de gènes dont l'expression est fortement régulée (Shi *et al.*, 1994). La transcription des gènes codant les cathepsines peut être contrôlée par de nombreux facteurs de régulation tels que AP-1 (*activator protein*), AP-2, AP-3, IRF-1 (*IFN regulatory factor*), Sp1 (*Specificity protein*), Sp3, Ets1 (*E-twenty-six*) et NF-Y (*Nuclear transcription factor Y*) (Troen *et al.*, 1991; Yan *et al.*, 2000; Jean *et al.*, 2002; Lecaille *et al.*, 2008). La liaison de ces facteurs de régulation résulte des cascades de signalisation initiées en réponse à des cytokines ou à des facteurs de croissance. L'interféron- γ (IFN- γ) stimule l'expression des cathepsines B, K et L par les macrophages, et l'expression de la cathepsine S par les cellules épithéliales comme les kératinocytes, via les voies de signalisation JAK (*janus kinase*)/STAT (*signal transducers and activators of transcription*) et NFkB (Li & Bever, 1996; Storm van's Gravesande *et al.*, 2002; Schwarz *et al.*, 2002). Au contraire, l'expression de la cathepsine S par les macrophages est régulée négativement par l'IL-10, ce qui a pour effet d'inhiber la présentation antigénique par ces cellules (Chan *et al.*, 2010). D'autre part, la sécrétion de la cathepsine L par les fibroblastes est stimulée par des facteurs de croissance comme le FGF (*fibroblast growth factor*) (Lemaire *et al.*, 1997; Ishidoh and Kominami, 1998). L'expression de la cathepsine K par les ostéoclastes est contrôlée par l'activation de la voie RANK (*receptor activator of NFkB*)/RANKL (*RANK ligand*) par le TNF- α (Troen, 2006). D'autre part, l'expression de la cathepsine K est modulée par le TGF au niveau du tissu pulmonaire (van den Brûle *et al.*, 2005) (voir chapitre 1.4.4.3.3)

1.2.2. Régulation par le pH et la force ionique

Les cathepsines à cystéine sont actives à pH acide comme celui des compartiments endosomaux et lysosomaux (pH 4-6). Le pH a longtemps été considéré comme le facteur majeur de régulation de l'activité des cathepsines. La plupart des cathepsines sont inactivées à pH neutre à l'exception de la cathepsine S, qui reste stable et active après une heure d'incubation à pH 7,4 (Kirschke *et al.*, 1989; Shi *et al.*, 1992; Brömme, *et al.*, 1996a; Brömme

et al., 1999) (**Figure 8**). Les cathepsines B et L, quant à elles sont instables à pH neutre et rapidement inactivées de façon irréversible à pH 7 (Turk *et al.*, 1995).

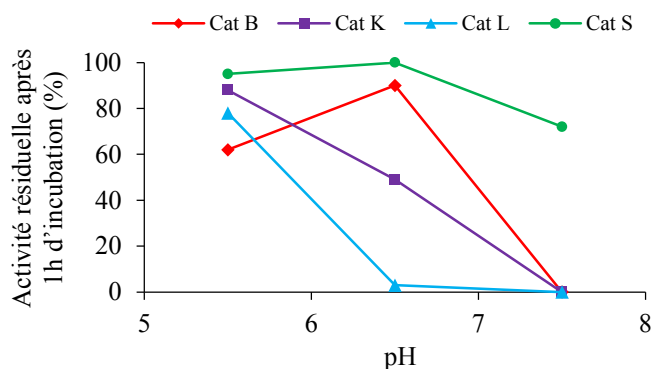


Figure 8 : Activité *in vitro* des cathepsines à cystéine en fonction du pH

Les cathepsines B, K, L et S ont été pré-incubées pendant une heure à pH 5,5, 6,5 et 7,5. L'activité résiduelle est mesurée par spectrofluorimétrie. (illustration adaptée de Kirschke *et al.*, 1989; Brömme *et al.*, 1996a).

Cependant, il existe des mécanismes moléculaires et cellulaires qui vont soit stabiliser les cathepsines à pH neutre soit acidifier le milieu extracellulaire, ce qui permet aux cathepsines d'être actives en dehors du compartiment lysosomal. La force ionique notamment, influence l'activité des cathepsines à pH neutre. Il a été montré *in vitro* que les cathepsines B et L sont stables et actives à pH neutre dans la solution saline de Hank (*Hank's balanced salt solution*, ou HBSS, pH 7,4) dont la composition ionique est comparable à celle du milieu extracellulaire (Dehrmann *et al.*, 1995; Dehrmann *et al.*, 1996). Cependant, il semblerait que seules les cathepsines activées, c'est-à-dire dont la cystéine du site actif est sous forme réduite, restent stables dans ces conditions, ce qui suggère un rôle de la paire thiolate-imidazolium du site actif dans la stabilité des cathepsines à pH neutre. L'activité extralysosomale des cathepsines peut également être maintenue grâce à une acidification du milieu extracellulaire. Les macrophages utilisent un système de pompe à protons ATP dépendante de type vacuolaire (V-H⁺-ATPase) pour pomper les protons du cytoplasme vers le milieu extracellulaire et acidifier ainsi l'environnement péri-cellulaire, ce qui permet ainsi aux cathepsines K, L et S sécrétées de dégrader l'élastine (Punturieri *et al.*, 2000). Le même mécanisme est utilisé par les ostéoclastes pour maintenir l'activité extracellulaire de la cathepsine K sécrétée (Lecaille *et al.*, 2008). Les cellules tumorales utilisent des canaux sodiques voltage dépendants comme le canal Na(V) 1.5 pour acidifier le milieu extracellulaire et ainsi maintenir l'activité péri-cellulaire des cathepsines (Gillet *et al.*, 2009).

1.2.3. Régulation par le stress oxydatif

L'activité protéolytique des cathepsines peut également être modulée en condition physiologique ou physiopathologique par un certain nombre d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote. Le thiol de la cystéine (Cys25) du site catalytique est particulièrement sensible aux agents oxydants (Ascenzi *et al.*, 2001). Il a été suggéré que la NADPH oxydase 2 (NOX2) joue un rôle dans la régulation physiologique de l'activité des cathepsines à cystéine au niveau du compartiment endosomal des macrophages (Rybicka *et al.*, 2010). NOX2 inactive les cathepsines directement par la génération d'espèces réactives de l'oxygène (anions superoxydes, peroxyde d'hydrogène) ou indirectement par diminution du potentiel réducteur de l'endosome. Les cathepsines B, L et S sont inactivées par l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ de façon irréversible même en présence d'un agent réducteur comme le dithiotréitol (DTT) (Nagaoka *et al.*, 2005). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), qui est impliqué dans le stress oxydatif au niveau cellulaire, est capable d'inhiber l'automaturation de la procathepsine K et d'inactiver la cathepsine K mature (Godat *et al.*, 2008). La cystéine du site actif de la cathepsine K se trouve alors soit sous forme d'acide sulfonique ($-\text{SO}_3\text{H}$, ~ 70% de l'enzyme), qui est une forme oxydée non réductible, soit sous forme d'acide sulfénique ($-\text{SOH}$, ~ 30% de l'enzyme), qui peut être réduit par le DTT, ce qui permet de rétablir l'activité de l'enzyme. De la même manière que H_2O_2 , les molécules d'oxyde nitrique issues du S-nitroso-glutathion (GSNO) ou de la S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) sont également capables d'inhiber l'automaturation de la procathepsine K et d'inactiver sa forme mature (Percival *et al.*, 1999). Il a été montré sur une lignée monocyttaire (THP-1) que l'activité protéolytique des cathepsines dans le milieu extracellulaire peut être préservée en condition de stress oxydatif grâce à l'action de la catalase (Hervé-Grépinet *et al.*, 2008) (voir chapitre 1.4.4.2).

1.2.4. Régulation par les glycosaminoglycanes

La structure des cathepsines à cystéine comporte des résidus chargés positivement (lysine et arginine) et des résidus chargés négativement (acide aspartique et acide glutamique). La valeur du point isoélectrique (pI) des cathepsines diffère d'une cathepsine à l'autre et est comprise entre 4,8 et 9,8 (**Tableau 1**). Au pH optimum d'activité des cathepsines à cystéine (pH 4-6) les cathepsines K, S et V sont chargées positivement (pI 7-9), alors que les cathepsines B et L sont neutres ou chargées négativement (pI ~5). Les glycosaminoglycanes (GAGs) sont des hétéropolysaccharides linéaires, constitués d'un nombre variable de diholosides et pouvant interagir avec de nombreuses protéines situées à la surface des cellules

(pour revue : Gandhi & Mancera, 2008). Ainsi, certains GAGs sulfatés chargés négativement comme l'héparine, l'héparane sulfate et les chondroïtines sulfates peuvent interagir avec les cathepsines chargées positivement et ainsi réguler leur stabilité et leur activité (pour revue : (Tersariol *et al.*, 2002; Turk *et al.*, 2012). Les GAGs sont capables de faciliter le processus d'automaturation de certaines cathepsines à pH acide. De nombreuses études ont montré que le sulfate de dextran accélère l'automaturation des cathepsines B et L (Mason and Massey, 1992; Ishidoh & Kominami, 1994; Rozman *et al.*, 1999) via des interactions électrostatiques avec la prorégion des cathepsines (Caglic *et al.*, 2007). Par un mécanisme similaire, l'héparine accélère la maturation de la procathepsine L en se fixant à un domaine de liaison à l'héparine BBXB (où B représente un résidu basique et X représente un résidu hydrophobe ou non chargé) situé sur la prorégion de l'enzyme (Fairhead *et al.*, 2008). La prorégion adopte une conformation relâchée et ne couvre plus le site actif, permettant ainsi à l'enzyme de cliver son propeptide et de s'en séparer (Caglic *et al.*, 2007). Néanmoins, à de fortes concentrations (>0.15%, m/v), telles que celles mesurées dans des pathologies humaines de type mucopolysaccharidoses ou ostéoporose, le chondroïtine 4-sulfate (C4-S) bloque spécifiquement *in vitro* la maturation de la cathepsine S ainsi que son activité collagénolytique (Sage et al., 2013).

L'activité des cathepsines B, K et X peut être régulée par les GAG à pH neutre. La stabilité et l'activité endopeptidasique de la cathepsine B à pH 7,4 sont augmentées en présence d'héparane sulfate et d'héparine (Almeida *et al.*, 2001). L'analyse par dichroïsme circulaire montre que la structure secondaire de la cathepsine B n'est pas modifiée à pH 7,4 en présence d'héparine. De plus, des études de modélisation moléculaire suggèrent que l'héparine augmente la stabilité de la cathepsine B à pH neutre en diminuant sa flexibilité structurale (Costa *et al.*, 2010). De la même manière, le C4-S favorise la stabilité de la cathepsine K à pH neutre (Li *et al.*, 2000). En plus de leur capacité à réguler l'automaturation et la stabilité des cathepsines à pH neutre, les GAG peuvent également moduler l'activité protéolytique des cathepsines. L'activité collagénolytique de la cathepsine K est dépendante uniquement du C4-S qui va interagir avec l'enzyme et permettre la formation d'un complexe oligomérique unique via des interactions électrostatiques (Li *et al.*, 2008). Le complexe formé entre la cathepsine K et le C4-S est capable de dégrader le collagène, tandis que l'enzyme sans C4-S est dépourvue d'activité collagénolytique. D'autre part, la formation de ce complexe implique des exosites localisés en dehors du site actif de la cathepsine K (Li *et al.*, 2002; Li *et al.*,

2004). En revanche, l'héparane sulfate et l'héparine inhibent l'activité élastinolytique des cathepsines K et V (Yasuda *et al.*, 2004).

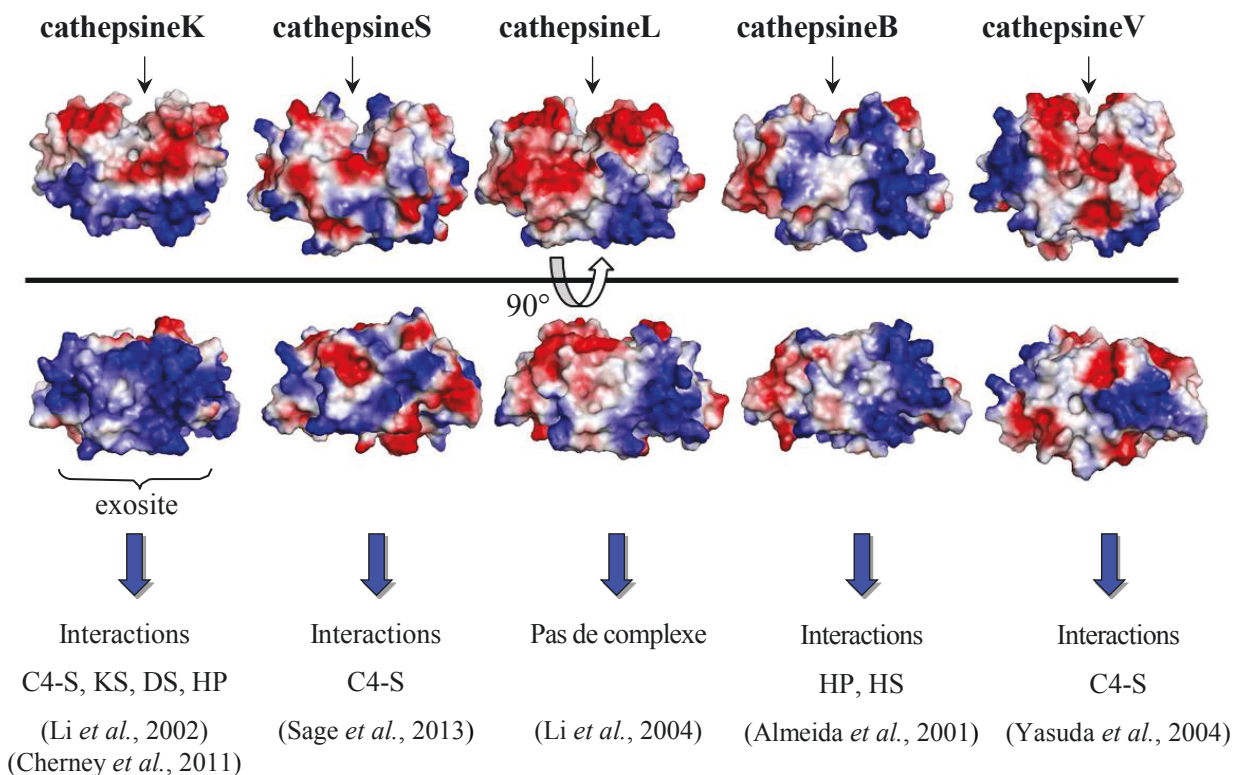


Figure 9 : Potentiel de surface des cathepsines K, S, L, B et V.

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

1.2.1. Inhibiteurs endogènes spécifiques : superfamille des cystatines

Les inhibiteurs endogènes qui contrôlent l'activité protéolytique des cathepsines à cystéine appartiennent à la superfamille des cystatines (**Tableau 3**). Ce sont des inhibiteurs compétitifs et réversibles qui présentent des homologies importantes au niveau structural et fonctionnel. La superfamille des cystatines se divise, selon les homologies de séquences, en 3 familles : les stéfines (type 1), les cystatines (type 2) et les kininogènes (type 3) (Barrett *et al.*, 1986). Comme pour les cathepsines à cystéine, en plus d'être classées par « types », les cystatines sont également classées en clan et familles ; elles appartiennent au clan IH, famille I25 (<http://merops.sanger.ac.uk/>) (Rawlings *et al.*, 2014).

Tableau 3 : Valeurs des constantes d'inhibition (K_i) des inhibiteurs endogènes des cathepsines à cystéine.

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

	Cystatines				Tyropines			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

1.2.1.1. Les stéfines

Les stéfines (famille I25A) sont des protéines d'environ 11 kDa dont la structure est constituée d'une chaîne polypeptidique, non glycosylée et ne comportant pas de pont disulfure. Elles sont principalement exprimées aux niveau des épithélia et même si elles sont principalement intracellulaires, il est possible de les retrouver dans les fluides biologiques (Abrahamson *et al.*, 1986). Deux types de stéfines sont exprimées chez l'Homme : les stéfines A et B (appelées aussi cystatines A et B). La stéfine A est exprimée dans les cellules épithéliales de la peau, où elle est notamment colocalisée avec la cathepsine L (Palungwachira *et al.*, 2002). Le contrôle de l'activité de la cathepsine L par la stéfine A limiterait la migration des cellules cancéreuses issues d'un carcinome de la peau. La stéfine A participe également à l'immunité innée de la peau en régulant l'activité des protéases à cystéine de pathogènes (Henskens *et al.*, 1996). La stéfine B quant à elle, est exprimée de façon plus ubiquitaire et contrôle l'activité des cathepsines à cystéine cytosoliques (Turk & Bode, 1991). La stéfine B est localisée également au niveau du noyau des cellules où elle interagirait avec les histones et régulerait l'activité de la cathepsine L intranucléaire (Ceru *et al.*, 2010).

1.2.1.2. Les cystatines

Les cystatines (famille I25B) sont des protéines de 13-14 kDa constituées d'environ 115 résidus, et dont la structure est stabilisée par deux ponts disulfures. Il en existe huit chez l'Homme : les cystatines C, D, F, G, M/E, S, SA et SN (Turk & Bode, 1991). Contrairement aux autres cystatines, les cystatines F, E/M et S sont glycosylées. A l'inverse des stéfines, les cystatines sont synthétisées avec un peptide signal qui permet leur sécrétion dans le

compartiment extracellulaire. Elles sont de ce fait retrouvées dans la plupart des fluides biologiques de l'organisme (Abrahamson *et al.*, 1986). Les cystatines D, G, S, SA et SN sont principalement exprimées dans la salive et les fluides séminaux (Isemura *et al.*, 1991; Abrahamson *et al.*, 2003; Wallin *et al.*, 2010). La cystatine E (aussi appelée cystatine M) est majoritairement exprimée par les cellules épithéliales de la peau et participerait au même titre que la stéfine A à l'homéostasie de l'épiderme (Cheng *et al.*, 2006; Zeeuwen *et al.*, 2009). La cystatine F présente la particularité d'être synthétisée sous la forme d'un précurseur dimérique (pour revue : Magister & Kos, 2013). Elle est majoritairement exprimée par les cellules de l'immunité telles que les cellules dendritiques, les monocytes, les cellules NK ou encore les lymphocytes T cytotoxiques, et participerait à la régulation de la réponse immunitaire. La cystatine C est présente dans de nombreux fluides extracellulaires, en particulier dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et le plasma séminal (Abrahamson *et al.*, 2003). La cystatine C est la plus caractérisée et également un des plus puissant inhibiteur extracellulaire des cathepsines à cystéine (*Ki* de l'ordre du picomolaire pour les cathepsines K, L et S) (**Tableau3**).

1.2.1.3. Les kininogènes

Les kininogènes (famille I25C) sont connus depuis longtemps comme les précurseurs des kinines vaso-actives, notamment la bradykinine (BK), et ce sont des protéines plasmatiques circulantes impliquées dans la cascade de la coagulation (Kato *et al.*, 1981). Ils ont par la suite été identifiés comme des inhibiteurs des protéases à cystéine (Barrett *et al.*, 1986). Contrairement aux stéfines et à la majorité des cystatines, les kininogènes sont glycosylés et leur structure est plus complexe puisqu'ils sont constitués de cinq à six domaines dont deux d'entre eux sont des domaines inhibiteurs de type cystatine. Chez l'Homme il existe deux types de kininogènes obtenus par épissage alternatif : le kininogène de haut poids moléculaire (HMWK pour *High Molecular Weight Kininogen*) d'environ 120 kDa, et le kininogène de bas poids moléculaire (LMWK pour *Low Molecular Weight Kininogen*) d'environ 70 kDa (Kitamura *et al.*, 1985; Salvesen *et al.*, 1986). Il existe un troisième type de kininogène présent chez le rat uniquement : le T-kininogène (ou thiostatine) (Esnard & Gauthier, 1983). Les kininogènes sont constitués d'une chaîne lourde située du côté N-terminal et d'une chaîne légère située du côté C-terminal. Les deux chaînes sont liées par un pont disulfure et sont situées de part et d'autre du domaine de la BK (**Figure 10**). Les chaînes lourdes du HMWK et du LMWK sont constituées d'un domaine de liaison au calcium (D1), de 2 domaines inhibiteurs des cathepsines à cystéine (D2 et D3) et du domaine BK (D4). La chaîne légère du

LMWK est constituée du domaine D5, dont la fonctionnalité n'est pas encore bien établie, et celle du HMWK possède en plus un domaine D6 de liaison au facteur XI de la coagulation (Müller-Esterl, 1987; Higashiyama *et al.*, 1987).

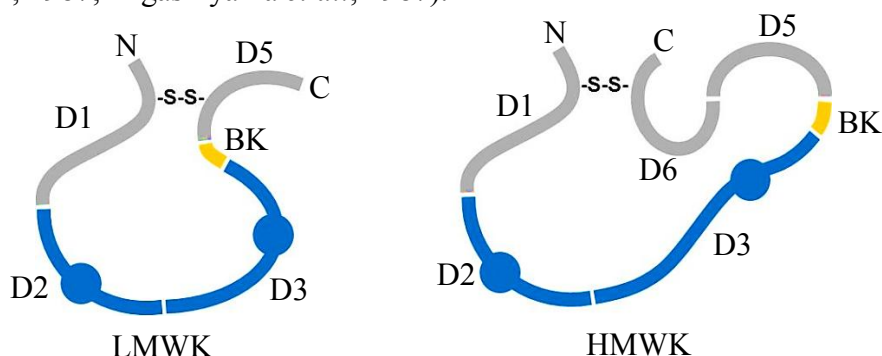


Figure 10 : Schéma de la structure des kininogènes humains

D2 et D3 : domaines inhibiteurs des cathepsines à cystéine (en bleu). BK : domaine de la bradykinine (en jaune). Chaîne légère : domaines D5 et D6.

Les kininogènes sont des inhibiteurs efficaces des cathepsines à cystéine (K_i de l'ordre du picomolaire), à l'exception de la cathepsine B, dont la boucle d'occlusion limite l'accès de l'inhibiteur au site actif (K_i de l'ordre du micromolaire). De plus, en conditions physiopathologiques la cathepsine B serait capable de cliver le HMWK, notamment au niveau des domaines D2 et D3 (Naudin *et al.*, 2010). Les kininogènes possèdent en plus de leur fonction d'inhibiteur des cathepsines à cystéine et de précurseur des kinines d'autres fonctions découvertes récemment (pour revue : Lalmanach *et al.*, 2010). En effet, un fragment issu du clivage protéolytique du HMWK, dénommé HKa, possède des propriétés anti-angiogéniques et pro-apoptotiques (Colman *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2000). Enfin, deux fragments protéolytiques de 20 et 26 résidus provenant respectivement des domaines D5 et D3 du HMWK présentent des propriétés antibactériennes (Nordahl *et al.*, 2005; Frick *et al.*, 2006).

1.2.1.4. Mécanisme d'inhibition des cathepsines par les cystatines

Les cystatines inhibent réversiblement les cathepsines en formant un complexe stable selon une stœchiométrie enzyme inhibiteur 1:1 pour les cystatines et 1:2 pour les kininogènes en raison de la présence de deux domaines inhibiteurs (D2 et D3) sur leur chaîne lourde (Turk *et al.*, 1996). L'analyse cristallographique de la cystatine C aviaire et de la stéfine B complexées avec la papaïne a permis de mettre en évidence le mécanisme général d'inhibition (Bode *et al.*, 1988; Stubbs *et al.*, 1990). Il a été montré que celui-ci dépend de trois régions hautement conservées (pour revue : Bode & Huber, 1992). La première région, dite « substrat-like », est située du côté N-terminal et contient une séquence consensus LVG dans laquelle la glycine est invariante (**Figure 11**) (Abrahamson *et al.*, 1987). La seconde région est localisée au niveau

de la boucle 1 et comporte un motif QVVAG qui va stabiliser le complexe enzyme-inhibiteur (Bode *et al.*, 1990; Stubbs *et al.*, 1990). La troisième région située au niveau de la boucle 2 du côté C-terminal contient le doublet PW absent chez les stéfine et sur le domaine D2 des kininogènes (Björk & Ylinenjärvi, 1990). La région N-terminale LVG s'insère au niveau du site actif de l'enzyme, et interagit avec les sous-sites S1, S2 et S3 (Bode *et al.*, 1990). Les boucles 1 (QVVAG) et 2 (PW) quant à elles interagissent respectivement avec les sous-sites S'1 et S'2.

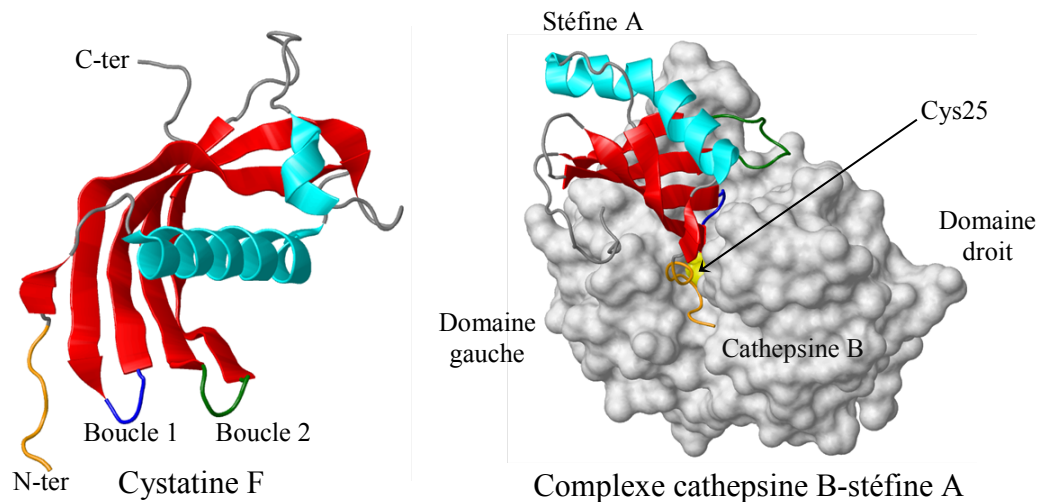


Figure 11 : Structure tridimensionnelle de la cystatine F et du complexe entre la stéfine A et la cathepsine B

Le domaine N-terminal « substrat-like » de la cystatine F (pdb 2ch9) contenant la glycine invariante est représenté en orange, la boucle 1 comportant le motif QVVAG est représentée en bleu et la boucle 2 comportant le doublet PW est représentée en vert. La cathepsine B est représentée en potentiel de surface (en gris) (pdb 3k9m).

1.2.2. Autres inhibiteurs non spécifiques

1.2.2.1. α -2 macroglobuline

L' α -2 macroglobuline est une protéine circulante présente dans le plasma et les liquides interstitiels, constituée de quatre sous-unités de 185 kDa chacune (Hudson & Koo, 1982). Elle inhibe de façon irréversible et non spécifique les protéases de différentes classes, dont les cathepsines à cystéine en les piégeant dans sa structure tétramérique (Barrett & Starkey, 1973). L'interaction inhibiteur-enzyme induit un changement de conformation de l' α -2 macroglobuline, qui va ensuite interagir avec des récepteurs localisés à la surface des macrophages et permettre l'élimination du complexe par endocytose (Kaplan & Nielsen, 1979).

1.2.2.2. Les thyropines

Les membres de la famille des thyropines (pour *thyroglobulin type-1 domain proteinase inhibitors*) possèdent tous en commun une séquence conservée, riche en cystéine, issue du domaine de type 1 de la thyroglobuline humaine (Lenarcic & Turk, 1999). Certaines thyropines inhibent les cathepsines à cystéine (**Tableau3**). C'est le cas notamment de la saxiphiline issue de la grenouille, de l'équistatine extraite de l'anémone de mer, ou encore du fragment p41 dérivé de la chaîne invariante Ii du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) (Bevec *et al.*, 1997; Lenarcic *et al.*, 1997; Lenarcic *et al.*, 2000).

1.2.2.3. Les serpines

Les serpines (pour *serine proteinase inhibitors*) sont, comme leur nom l'indique, essentiellement des inhibiteurs des protéases à sérine. Cependant, certaines d'entre elles inhibent également les cathepsines à cystéine (**Tableau3**). La protéine humaine SCCA1 (pour *squamous cell carcinoma antigen 1*) inhibe les cathepsines K, L et S, alors que l'hurpine et la serpine endopine 2C inhibent sélectivement la cathepsine L (Schick *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 2005; Bylaite *et al.*, 2006).

1.2.3. Inhibiteurs synthétiques

A l'origine, les inhibiteurs synthétiques des protéases servaient à comprendre les mécanismes qui régissent leur activité protéolytique. Aujourd'hui, l'étude de ces inhibiteurs a pour objectif de développer des traitements thérapeutiques efficaces vis à vis de certaines pathologies humaines telles que l'ostéoporose, arthrite rhumatoïde, cancer, Alzheimer, etc... Les inhibiteurs synthétiques des protéases à cystéine comprennent des inhibiteurs peptidiques réversibles dérivés de nitriles ou d'aldéhydes et des inhibiteurs peptidiques irréversibles tels que les diazométhanes, les dérivés époxy ou encore les vinyl-sulfones.

1.2.3.1. Inhibiteurs réversibles

Les premiers inhibiteurs réversibles décrits sont des peptides aldéhydes, issus de souches de *Streptomyces* comme la leupeptine et l'antipaïne, peu sélectifs des cathepsines à cystéine (Rich *et al.*, 1986). Par la suite, d'autres inhibiteurs analogues ont été développés dans le but d'améliorer leur sélectivité (Shaw, 1990). Outre les peptides aldéhydes, il existe d'autres types d'inhibiteurs réversibles : les peptidyl céto-ester amides (ou acides), les peptidyl(acyloxy)méthanés dont la réactivité diffère vis-à-vis des cathepsines B, L et S, et les

peptides de type diacyl hydroxamate (pour revue : Lecaille, *et al.*, 2002b). Il existe également des dérivés peptidiques et non peptidiques de nitriles et de cyanamides, qui inhibent efficacement et réversiblement les cathepsines (Falgueyret *et al.*, 2001; Asaad *et al.*, 2009; Frizler *et al.*, 2010).

1.2.3.2. Inhibiteurs irréversibles

Les peptidyl-chloro-méthyl cétones sont les premiers inhibiteurs irréversibles décrits (Shaw, 1990). Cependant, du fait de leur haute réactivité, ils peuvent également inhiber les protéases à sérine et s'associer avec d'autres molécules possédant des groupements thiols comme le glutathion ou encore certaines enzymes non protéolytiques comme la peroxydase. Ainsi, la substitution du chlore par un fluore, donnant lieu à des inhibiteur de type fluoro-méthyl cétone, a permis d'obtenir une sélectivité satisfaisante de ce type de composé vis-à-vis des cathepsines à cystéine (Shaw, 1990; Harth *et al.*, 1993). Il existe également des inhibiteurs de type peptidyl-diazométhyl cétones, sélectifs des protéases à cystéine, développés à partir de la séquence « substrat-like » de la cystatine C (Z-LVG-CHN₂) (Grubb *et al.*, 1990).

En plus de la mise au point de ces inhibiteurs synthétiques, un autre inhibiteur peptidique dérivé d'epoxy-succinyl a été extrait du champignon *Aspergillus japonicus* : le L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino)butane, ou E-64 (Barrett *et al.*, 1981). C'est un inhibiteur sélectif des protéases à cystéine puisqu'il va agir par alkylation de la cystéine (Cys25) du site actif. L'E-64 agit de façon dose-dépendante selon un ratio enzyme : inhibiteur 1:1 et sert d'agent de titrage pour les enzymes de la famille de la papaïne (Barrett *et al.*, 1982). Le mécanisme d'inhibition de l'E-64 implique le sous-site S1 qui interagit avec le groupement epoxy, alors le résidu leucine se positionne au niveau du sous-site S2 (**Figure 12**). D'autres inhibiteurs plus sélectifs ont été développés à partir de l'E-64 comme le CA-030 ou le CA-074 qui inhibent la cathepsine B, et les inhibiteurs CLIK (pour *cathepsin L inhibitors Katunuma*) qui inhibent la cathepsine L (Sumiya *et al.*, 1992; Katunuma *et al.*, 1999). En raison de leur toxicité *in vivo*, ces inhibiteurs ne pourraient pas être utilisés comme traitements thérapeutiques. Cependant une nouvelle classe d'inhibiteurs : les vinyl-sulfones, semblent plus prometteurs puisqu'ils présentent peu de toxicité apparente et sont sélectifs des cathepsines K, L et S (Palmer *et al.*, 1995; Brömme, *et al.*, 1996b). Ces inhibiteurs se positionnent de part et d'autre du site actif et le bloque via une liaison pseudo-peptidique non hydrolysable (Thompson *et al.*, 1997). Cependant, de par leur irréversibilité, ce type d'inhibiteurs ne pourrait pas être utilisé pour traiter une pathologie chronique comme

l'ostéoporose par exemple. Ils seraient plus adaptés pour des traitements ponctuels, notamment lors des thérapies qui ciblent les protéases à cystéine de parasites.

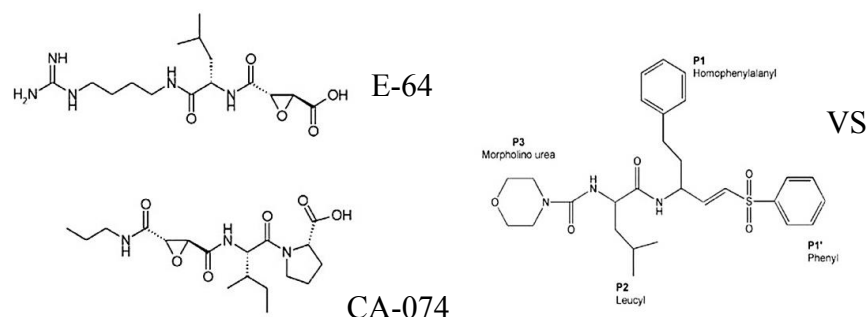


Figure 12 : Structure des principaux inhibiteurs synthétiques des cathepsines à cystéine

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 (morpholineurea-Leu-homophénylalanine-(vinylsulfonyl)benzène) inhibe spécifiquement la cathepsine S. (d'après Stern *et al.*, 2004)

1.2.3.3. Inhibiteurs pharmacologiques

Du fait du rôle crucial des cathepsines à cystéine dans certaines pathologies (voir le chapitre suivant), les laboratoires ainsi que les industries pharmaceutiques les considèrent comme des cibles thérapeutiques pertinentes. Le développement d'inhibiteurs de cathepsines requiert de respecter certains critères, dont la taille et le caractère pseudo-peptidique afin d'être non-immunogènes. Ils doivent être très sélectifs vis-à-vis de la cathepsine ciblée (affinité pour la cible 100 fois supérieure à celle pour les autres cathepsines) et se lier réversiblement au site actif. Enfin, les inhibiteurs doivent répondre aux critères pharmacologiques standards de forte biodisponibilité, faible toxicité, demi-vie importante et faible constante d'élimination, aussi bien dans le cadre d'un traitement ponctuel que dans celui d'un traitement chronique (Brömme & Lecaille, 2009).

Tableau 4 : Inhibiteurs thérapeutiques de cathepsines à cystéine en essais cliniques.

(d'après Palermo & Joyce, 2008; Gupta *et al.*, 2008; Wijkmans and Gossen, 2011; Payne *et al.*, 2014; Fonović & Turk, 2014)

	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
	CRA-013783	Ostéoporose	Phase I	Merck/Celera
	OST-4077	Maladies osseuses	Préclinique	Dong-A Research Laboratories
	SB-553484	Ostéoporose, métastases osseuses	Préclinique	GlaxoSmithKline
	MIV-711	Ostéoporose	Phase I	Medivir
Cathepsine S	RWJ-445380	Arthrite rhumatoïde, psoriasis	Phase II	Johnson & Johnson
	CRA-028129	Psoriasis	Phase I	Schering AG
	VBY-891	Psoriasis	Phase I	Virobay
	VBY-036	Douleurs neuropathiques, maladie de Crohn	Phase I	Virobay
	LY3000328	Anévrisme aortique	Phase I	Eli Lilly
Cathepsine B	BDI-7800	Cancers	Préclinique	Biopharmacopae
	ALP-496	Maladie d'Alzheimer	Préclinique	American Life Science Pharmaceuticals
	VBY-376	Fibrose hépatique	Phase I	Virobay

Seules les cathepsines K et S sont validées aujourd'hui comme des cibles thérapeutiques, la cathepsine K est ciblée majoritairement dans le cadre de l'ostéoporose, et la cathepsine S quant à elle est ciblée dans le cadre des maladies auto-immunes, du psoriasis et des arthrites rhumatoïdes (Palermo & Joyce, 2008). Parmi les inhibiteurs de la cathepsine K, l'Odanacatib (Merck) est en phase d'essais clinique III depuis 2009 (Wijkmans & Gossen, 2011). Depuis 2013, de nouveaux inhibiteurs sélectifs de la cathepsine S développés par la compagnie Virobay sont en cours d'essais cliniques (Fonović & Turk, 2014). Des inhibiteurs de la cathepsine B sont actuellement en cours de développement dans le cadre du traitement contre la maladie d'Alzheimer et contre certains cancers (Gupta *et al.*, 2008). A l'heure actuelle, un seul inhibiteur de la cathepsine B est en phase clinique I dans le cadre du traitement de la fibrose hépatique (Fonović & Turk, 2014).

1.3. Fonctions physiologiques et pathologiques des cathepsines à cystéine

1.3.1. Fonctions physiologiques

Les cathepsines à cystéine sont principalement connues pour leur fonction de recyclage des protéines internalisées dans le compartiment intralysosomal (Barrett, 1992). Elles peuvent également intervenir dans des processus physiologiques plus spécifiques tels que l'activation de précurseurs protéiques (pro-enzymes et pro-hormones), la présentation des antigènes par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, le remodelage osseux et l'apoptose (Turk *et al.*, 2012).

1.3.1.1. Maturation de précurseurs protéiques

Les cathepsines à cystéine interviennent dans la maturation et l'activation de nombreux précurseurs protéiques. Les cathepsines B, K, L et S sont capables de générer l'hormone thyroïdienne : la thyroxine (T_4), à partir de la thyroglobuline (Jordans *et al.*, 2009). La cathepsine H participe à la maturation de la protéine du surfactant pulmonaire SP-B (Guttentag *et al.*, 2003). Les cathepsines B et C participent à l'activation de nombreuses pro-enzymes, la cathepsine C est capable d'activer de nombreuses protéases à sérine comme la cathepsine G (CatG), l'élastase de neutrophile (*human neutrophil elastase*, HNE), la protéase-3 (Pr3) et les granzymes A et B (Pham & Ley, 1999; Adkison *et al.*, 2002). La cathepsine B quant à elle participe à la maturation de la pro- β -galactosidase, de la pro-rénine, de la pro-stromélysine et du trypsinogène (Murphy *et al.*, 1992; Okamura-Oho *et al.*, 1997; Jutras & Reudelhuber, 1999; Halangk *et al.*, 2000). Au niveau des vésicules neuronales, la cathepsine L joue un rôle dans la génération de certains neuropeptides comme l'encéphaline, la β -endorphine et la dynorphine, à partir de leur précurseur protéique (Funkelstein and Hook, 2011). La cathepsine X est impliquée dans la régulation de la migration des lymphocytes T via l'activation de deux récepteurs de l'intégrine $\beta 2$: Mac-1 et LFA-1 (Obermajer *et al.*, 2008). Les cathepsines sont également capables d'inactiver des inhibiteurs de protéases, ce qui, en conditions pathologiques, participe au déséquilibre protéases/antiprotéases en faveur de la protéolyse. Les cathepsines B, L et S sont capables de cliver le SLPI (*secretory leucocyte protease inhibitor*) et de compromettre ainsi son activité inhibitrice vis-à-vis des protéases sérine, comme l'élastase humaine de neutrophile (HNE) (Taggart *et al.*, 2001). La cathepsine B est également capable de dégrader et d'inactiver les inhibiteurs des MMPs

(*matrix metalloproteinases*), notamment les TIMPs (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) -1 et -2 (Kostoulas *et al.*, 1999).

1.3.1.2. Présentation antigénique

Les cathepsines à cystéine sont impliquées dans l'immunité adaptative puisqu'elles participent à la formation de peptides antigéniques et à la maturation des molécules du CMH de classe II (**Figure 13**). Il a été montré *in vitro* que les cathepsines B, L et S ainsi que d'autres protéases lysosomales comme la légumaïne ou la cathepsine D, génèrent des peptides antigéniques après dégradation d'un antigène (Katunuma *et al.*, 1998). Les cathepsines vont également procéder à la maturation de la chaîne invariante Ii du CMH de classe II. La chaîne invariante Ii est une protéine de 31 kDa qui se fixe aux chaînes α et β du CMH de classe II et assure ainsi sa stabilité. La chaîne invariante Ii permet également l'adressage du CMH de classe II au compartiment lysosomal et empêche la fixation précoce de peptides antigéniques. La chaîne Ii va subir plusieurs clivages, jusqu'à l'obtention d'un peptide de 15 résidus, le CLIP (pour *Class-II associated invariant chain peptide*). Ce peptide est ensuite remplacé par un peptide antigénique qui sera présenté à la surface cellulaire (Riese & Chapman, 2000).

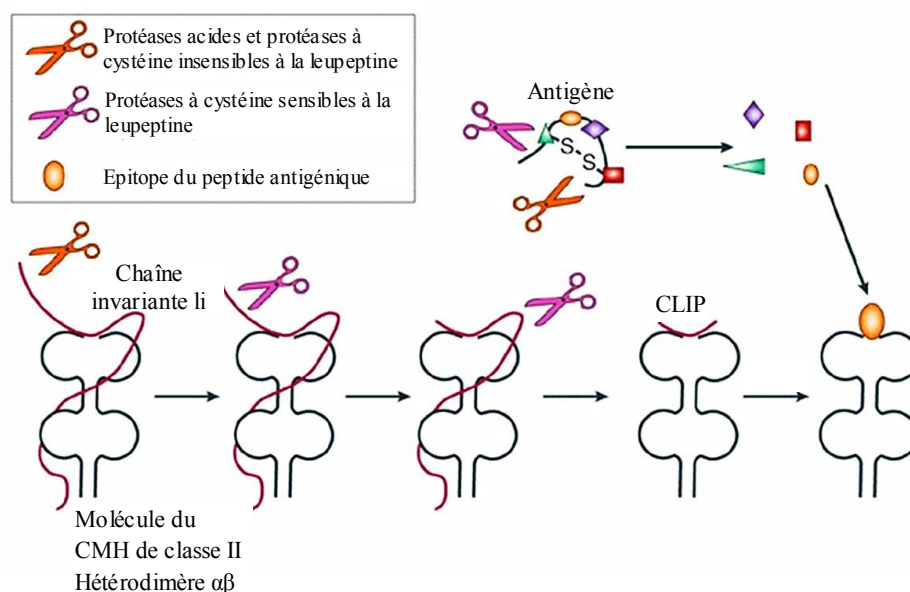


Figure 13 : Rôle des protéases à cystéine dans la présentation antigénique par le CMH de classe II.

Les cathepsines à cystéine sont impliquées à la fois dans la maturation de la chaîne invariante Ii et dans la génération des peptides antigéniques (illustration extraite de Honey & Rudensky, 2003).

Des études réalisées sur des modèles de souris déficientes en cathepsine B ont montré que ces souris ne présentaient pas de défaut de présentation antigénique, ce qui suppose que la

cathepsine B ne joue pas un rôle critique dans ce processus (Deussing *et al.*, 1998). En revanche, l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de type vinyl-sulfone sélectif de la cathepsine S, le LHVS (morpholinourea-leuciny-l-homophenylalanine-vinylsulfone-phenyl) empêche le dernier clivage nécessaire à la maturation de la chaîne Ii, démontrant ainsi le rôle essentiel de la cathepsine S dans la génération du peptide CLIP (Riese *et al.*, 1996; Riese *et al.*, 1998). Ces résultats ont été confirmés à l'aide de modèles de souris déficientes en cathepsine S (Nakagawa *et al.*, 1999). Cependant, ces travaux ont également montré que la génération du peptide CLIP ne dépend pas de la cathepsine S dans toutes les cellules présentatrices d'antigène. Ainsi, la maturation de la chaîne Ii au niveau des cellules épithéliales corticales du thymus chez la souris dépend de la cathepsine L, tandis que chez l'Homme elle serait dépendante de la cathepsine V (Nakagawa *et al.*, 1998; Tolosa *et al.*, 2003).

1.3.1.3. Remodelage de la matrice extracellulaire

Au cours de processus physiologiques comme le remodelage ou la réparation tissulaire, la matrice extracellulaire et la membrane basale subissent une dégradation protéolytique contrôlée (Lu *et al.*, 2011). Les cathepsines à cystéine participent à ce processus tout comme les MMPs (exemple : MMP-1, -2 et -9) et les protéases à sérine (ex : HNE, Pr3, CatG) dont le rôle dans la dégradation et le remodelage matriciel est déjà bien décrit.

Les cathepsines B, F, K, L, S et V sont capables de dégrader l'élastine qui est pourtant connue pour être une protéine résistante à la protéolyse (Vrhovski & Weiss, 1998). Il a été montré *in vitro* que les cathepsines K et S hydrolysent l'élastine de façon plus efficace que d'autres enzymes élastinolytiques bien caractérisées comme la MMP-12 et l'HNE (Shi *et al.*, 1992; Chapman *et al.*, 1997). La cathepsine V possède également une forte activité élastinolytique (Yasuda *et al.*, 2004). Les auteurs ont également montré que la cathepsine V macrophagique dégrade l'élastine endocytée au niveau des compartiments lysosomaux, alors que les cathepsines K et S sécrétées dégradent l'élastine extracellulaire. Le fort potentiel élastinolytique de la cathepsine V dépend de deux exosites hydrophobes, dont l'un est situé à l'opposé du site actif et l'autre est adjacent aux sous-sites S1 à S3 de l'enzyme (Du *et al.*, 2013). Ces exosites stabilisent les interactions entre la cathepsine V et l'élastine. Un mécanisme similaire avait été proposé pour expliquer l'activité élastinolytique des cathepsines K et S (Novinec *et al.*, 2007). Contrairement aux autres cathepsines, la cathepsine K est la seule capable de dégrader des protéines fibreuses de la matrice extracellulaire comme les

collagènes de type I (constituant majeur de la matrice osseuse) et de type II (constituant majeur du cartilage). Elle présente plusieurs sites de clivage au niveau du domaine structuré en triple hélice et au niveau des extrémités C-terminale et N-terminale (appelées télépeptides) de ces collagènes (Kafienah *et al.*, 1998; Garnero *et al.*, 1998). Les cathepsines B, L et S quant à elles clivent le collagène uniquement au niveau des télépeptides tandis que les MMPs présentent un seul site de clivage au niveau de la structure hélicoïdale de la molécule. De façon intéressante, la cathepsine K possède la particularité de bien accepter un résidu proline au niveau de son sous-site S2 et un résidu glycine au niveau de son sous-site S3, ce qui lui confère en partie sa capacité à dégrader le collagène qui contient de nombreux motifs Gly-Pro-X dans sa séquence primaire (X représentant n'importe quel acide aminé) (Lecaille *et al.*, 2003; Choe *et al.*, 2006). Il a été montré récemment un nouveau mode de régulation de l'activité protéolytique des cathepsines et appelé « cannibalisme » (Barry & Platt, 2012). La cathepsine S pourrait cliver la cathepsine K et réduire son activité collagénolytique et élastinolytique. En plus des protéines de la matrice extracellulaire, les cathepsines à cystéine sont également capables de dégrader certains constituants de la membrane basale. Les cathepsines B et L sont notamment capables de dégrader *in vitro* le collagène IV, les laminines et la fibronectine (Guinec *et al.*, 1993). La cathepsine H dégrade la fibronectine (Tsushima *et al.*, 1991). En plus des collagènes insolubles (type I et II) la cathepsine K issue de fibroblastes dermiques dégrade aussi le collagène IV (Quintanilla-Dieck *et al.*, 2009). La cathepsine S quant à elle dégrade la laminine, le collagène IV, la fibronectine et le perlécan (Petanceska *et al.*, 1996; Liuzzo *et al.*, 1999; Burns-Kurtis *et al.*, 2004). Il a aussi été montré que les cellules endothéliales de souris déficientes en cathepsine S, cultivées sur un modèle de membrane basale, présentent un potentiel invasif fortement diminué du fait de la perte de leur capacité à dégrader les différents constituants (Shi *et al.*, 2003). Enfin, la cathepsine S est capable de cliver les nidogènes -1 et -2, qui sont des clés de voute dans l'architecture de la membrane basale en permettant l'interaction entre le collagène IV et la laminine-211/221, ce qui a pour conséquence d'altérer la membrane basale (Sage *et al.*, 2012).

Tableau 5 : Constituants de la matrice extracellulaire et de la membrane basale dégradés par les cathepsines à cystéine

MEC : matrice extracellulaire, MB : membrane basale

Cathepsine	Constituants de la MEC et de la MB dégradés par l'enzyme	Références bibliographiques
B	Élastine Collagènes I et II (télopeptides) Collagène IV Laminines Fibronectine	(Garnero <i>et al.</i> , 1998 ; Guinec <i>et al.</i> , 1993 ; Vrhovski & Weiss, 1998)
K	Élastine Collagènes I et II (triple hélice + téllopeptides) Collagène IV	(Garnero <i>et al.</i> , 1998 ; Kafienah <i>et al.</i> , 1998 ; Quintanilla-Dieck <i>et al.</i> , 2009 ; Vrhovski & Weiss, 1998)
L	Élastine Collagènes I et II (télopeptides) Laminines Fibronectine	(Garnero <i>et al.</i> , 1998 ; Guinec <i>et al.</i> , 1993 ; Vrhovski & Weiss, 1998)
S	Élastine Collagènes I et II (télopeptides) Collagène IV Laminines Fibronectine Nidogènes 1 et 2	(Burns-Kurtis <i>et al.</i> , 2004 ; Garnero <i>et al.</i> , 1998 ; Liuzzo <i>et al.</i> , 1999 ; Petanceska <i>et al.</i> , 1996 ; Sage <i>et al.</i> , 2012 ; Vrhovski & Weiss, 1998)
V	Élastine	(Vrhovski & Weiss, 1998 ; Yasuda <i>et al.</i> , 2004)

1.3.1.4. Apoptose

Bien que de nombreux travaux tendent à prouver l'implication des cathepsines à cystéine dans l'apoptose, leur rôle dans ce processus reste à ce jour encore peu connu. Il existe deux voies de signalisation aboutissant à l'apoptose : la voie extrinsèque dépendante de récepteurs membranaires appartenant à la famille des récepteurs du TNF- α , et la voie intrinsèque ou mitochondriale (pour revue : Repnik & Turk, 2010). Ces deux voies font intervenir des protéases à cystéine : les caspases (famille C14, clan CD). Les fonctions pro-apoptotiques des cathepsines s'exercent lorsque celles-ci sont relarguées dans le cytoplasme après perméabilisation du lysosome (Česen *et al.*, 2012). Les cathepsines B, K, L et S intra-cytoplasmiques clivent les facteurs anti-apoptotiques BCL2, BCL-xL et MCL1 (Blomgran *et al.*, 2007; Droga-Mazovec *et al.*, 2008). La cathepsine B serait impliquée dans la voie extrinsèque de l'apoptose dépendante du TNF- α et de TRAIL (*tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand*) et cliverait le facteur pro-apoptotique Bid, provoquant la perméabilisation de la membrane mitochondriale et le relargage du cytochrome C (Guicciardi *et al.*, 2000; Foghsgaard *et al.*, 2001; Nagaraj *et al.*, 2006; Turk and Turk, 2009). Cependant,

d'autres travaux réalisés sur plusieurs lignées cellulaires (U937, T98G, Jurkat) ou sur des cellules primaires de souris (cellules mammaires cancéreuses, fibroblastes dermiques et embryonnaires, hépatocytes) ont montrés que l'apoptose médiée par le TNF- α ou par Fas serait indépendante de la cathepsine B (Wattiaux *et al.*, 2007; Bojic *et al.*, 2007; Vasiljeva *et al.*, 2008; Klarić *et al.*, 2009; Oberle *et al.*, 2010). Jusqu'à présent il n'a pas été montré que les cathepsines interviennent directement dans la maturation des caspases, cependant il semblerait que la cathepsine C active la granzyme B, qui à son tour peut activer la caspase 3 (Pham & Ley, 1999).

1.3.2. Fonctions physiopathologiques

La plupart des pathologies dans lesquelles sont impliquées les cathepsines à cystéine sont liées à une perte de contrôle de leur activité protéolytique souvent due à une surexpression et/ou une localisation inhabituelle de ces protéases. En condition physiologique, les cathepsines à cystéine sont finement régulées par les mécanismes décrits précédemment, cependant un déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases peut se produire et ainsi donner lieu à diverses pathologies comme les arthrites rhumatoïdes, l'ostéoporose, ou encore l'athérosclérose (pour revue : Fonović & Turk, 2014). En revanche, il existe deux maladies génétiques humaines rares, associées à un déficit en cathepsine : la pycnodysostose (ou osteochondrodysplasie, appelée également la maladie de Toulouse-Lautrec) est une dysplasie osseuse (1 cas pour 100000), causée par une mutation du gène de la cathepsine K, résultant en une perte quasi-totale de son activité (voir le paragraphe suivant); et le syndrome de Papillon-Lefèvre (1 cas pour 250000), qui touche la peau (kératodermie) et les gencives et qui est dû à un déficit en cathepsine C.

1.3.2.1. Ostéoporose/pycnodysostose

Le remodelage régulier du tissu osseux est dépendant de l'équilibre entre l'activité des ostéoclastes, qui participent à la résorption osseuse, et celle des ostéoblastes qui synthétisent les constituants de la matrice osseuse. Le déséquilibre en faveur de l'activité ostéoclastique observé dans l'ostéoporose est lié à la perte du contrôle de l'activité de la cathepsine K. La cathepsine K est majoritairement impliquée dans le processus de résorption osseuse par les ostéoclastes puisqu'elle représente 98% de l'activité totale des protéases à cystéine de ces cellules (Brömme & Okamoto, 1995). Lors de ce processus, les ostéoclastes sécrètent au niveau de la lacune de résorption des protéases, telles que les MMPs et la cathepsine K, ainsi

que des protons qui vont acidifier l'environnement ; ce qui donne lieu à un mécanisme de résorption dit « acide ». Après la déminéralisation du tissu osseux, les fibres de collagènes I sont dégradées par la cathepsine K et les MMP-1 et MMP-8 (Brömme *et al.*, 1996a). La diminution de la résorption osseuse (~80%) sur des rats traités avec des inhibiteurs sélectifs de la cathepsine K, de type vinyl-sulfone, a permis de confirmer son rôle prépondérant dans ce processus (Xia *et al.*, 1999).

Il a été découvert en 1996 une maladie génétique affectant les os, due à une mutation au niveau du gène codant pour la cathepsine K : la pycnodysostose (Gelb *et al.*, 1996). Les ostéoclastes de patients atteints de cette pathologie conservent leur capacité à déminéraliser la matrice osseuse mais sont incapables de digérer les fibrilles de collagène phagocytées du fait de la perte de l'activité collagénolytique de la cathepsine K (Everts *et al.*, 1985). Des modèles de souris déficientes en cathepsine K présentent un phénotype similaire à celui retrouvé chez les patients atteints de pycnodysostose, ce qui confirme le rôle critique de la cathepsine K dans le processus de remodelage du tissu osseux (Saftig *et al.*, 1998).

1.3.2.2. Arthrites rhumatoïdes

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 1% de la population mondiale souffre d'arthrite rhumatoïde et cette pathologie touche trois fois plus de femmes que d'hommes. Il s'agit d'une maladie inflammatoire durant laquelle a lieu une destruction progressive du cartilage et de l'os sous-chondral susceptible de conduire à une perte de fonction de l'articulation (pour revue : Lecaille *et al.*, 2002b). Le tissu cartilagineux est composé d'un réseau élastique de fibres de collagène de type II et d'agrécane qui lui confèrent ses propriétés de résistance à la compression (Kempson *et al.*, 1973). Le phénomène arthritique survient après la dégradation protéolytique excessive de l'un ou l'autre de ces deux composants (Kempson *et al.*, 1976). Outre les MMPs qui participent à la dégradation du cartilage, l'utilisation d'inhibiteurs sélectifs des cathepsines B, K, L et S, exprimées par les fibroblastes synoviaux, a permis de mettre en évidence leur implication dans cette pathologie (Trabandt *et al.*, 1990; Trabandt *et al.*, 1991; Esser *et al.*, 1994; Hou *et al.*, 2001). L'expression des cathepsines par les fibroblastes synoviaux est dépendante de facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF- α , l'interleukine IL-1, le FGF (*fibroblast growth factor*) ou encore l'interféron- γ (Lemaire *et al.*, 1997; Hou *et al.*, 2002). Au stade le plus avancé de la maladie, la cathepsine K est principalement produite par les ostéoclastes et se retrouve dans les liquides synoviaux aux côtés des cathepsines B, L et S (Hashimoto *et al.*, 2001; Kontinen

et al., 2002; Pozgan *et al.*, 2010). Le pH acide (pH 5) et la présence de GAGs dans le tissu cartilagineux permet à la cathepsine K de dégrader le collagène de type II, tandis que l'ensemble des cathepsines présentes dans les liquides synoviaux sont capables de dégrader les complexes d'agrécanes (Nguyen *et al.*, 1990; Nguyen *et al.*, 1991; Hou *et al.*, 2001; Kontinen *et al.*, 2002).

1.3.2.3. Athérosclérose

L'athérosclérose est une cause principale de mortalité dans les pays industrialisés (selon l'OMS). Il s'agit d'une pathologie inflammatoire durant laquelle la paroi interne des artères perd progressivement son élasticité. Les artères sont obstruées par le dépôt et la formation de plaques d'athérome, constituées de lipides et de macrophages, pouvant causer des accidents vasculaires cérébraux ou des anévrismes aortiques (Liu *et al.*, 2004). Cette plaque évolue ensuite en plaque fibreuse avec l'apparition de cellules musculaire lisses issues de la paroi interne de l'artère, et de cellules conjonctives. Les cathepsines K et S ont été les premières cathepsines identifiées au niveau des lésions athérosclérotiques (Sukhova *et al.*, 1998). Elles sont abondamment exprimées par les macrophages et les cellules musculaires lisses qui constituent la plaque d'athérome et la perte d'élasticité de la paroi artérielle pourrait être liée à l'activité élastinolytiques de ces deux enzymes (Shi *et al.*, 1992; D. Brömme *et al.*, 1996; Lutgens *et al.*, 2007). D'autre part, la diminution de l'expression de la cystatine C favoriserait l'athérosclérose et la survenue d'anévrismes aortiques (Shi *et al.*, 1999). Des modèles de souris transgéniques déficientes en apolipoprotéine E (ApoE *-/-*) ou en récepteur des *low density lipoproteins* (LDLr *-/-*), et présentant un déficit supplémentaire en cathepsines K, L ou S sont protégées contre l'athérosclérose induite par un régime hyperlipidique (Sukhova *et al.*, 2003; Lutgens *et al.*, 2006; Kitamoto *et al.*, 2007). L'inhibition pharmacologique de la cathepsine S chez des souris ApoE *-/-* contribue à réduire la formation de la plaque d'athérome comparé aux souris non traitées (Samokhin *et al.*, 2010). Les cathepsines F et S seraient impliquées dans la dégradation des LDLs à l'origine de la génération de la plaque d'athérome (Oörni *et al.*, 2004; Linke *et al.*, 2006).

1.3.2.4. Cancer

Durant les phénomènes cancéreux, les étapes permettant le développement et l'expansion de la tumeur dépendent d'enzymes protéolytiques. Toutes les classes de protéases participent à ces phénomènes, y compris les cathepsines à cystéine (pour revue : Mohamed & Sloane, 2006). Dans un premier temps, les protéases induisent l'angiogenèse par la dégradation de la

matrice extracellulaire puis la libération et l'activation protéolytique de facteurs pro-angiogéniques (pour revue : Gocheva & Joyce, 2007). Elles vont également participer à l'invasion des cellules cancéreuses par clivage des jonctions intercellulaires. Enfin, les protéases jouent un rôle dans la dissémination des métastases par le biais des systèmes vasculaires et lymphatiques, pour former un foyer secondaire (pour revue : Palermo & Joyce, 2008). Les cathepsines à cystéine sont secrétées par les cellules tumorales et par les cellules du microenvironnement tumoral : fibroblastes, macrophages, cellules endothéliales, ostéoclastes, etc. (**Figure 14**). Le déséquilibre entre l'expression des cathepsines et de leurs inhibiteurs endogènes en faveur des cathepsines est associé à la présence de tumeurs malignes, ce qui suggère un rôle important de ces enzymes dans les pathologies cancéreuses (Kos & Lah, 1998). En effet, la surexpression des cathepsines a été montrée dans plusieurs types de cancer tels que le cancer du sein, du cerveau et du poumon (Berdowska, 2004). Les cathepsines secrétées dans le microenvironnement tumoral vont dégrader les constituants de la matrice extracellulaire et de la membrane basale et ainsi participer à l'invasion tumorale. L'utilisation d'inhibiteurs sélectifs des cathepsines B et L sur des cellules cancéreuses mammaires induit une diminution de leur invasivité (Gillet *et al.*, 2009). Ces travaux ont également montré que les cathepsines représentent 65% des protéases impliquées dans la dégradation de la membrane basale, associée à l'invasivité des cellules cancéreuses. D'autre part, les cathepsines B, H, L et S sont impliquées dans l'angiogenèse, la croissance et l'invasion tumorale dans des lignées de cellules cancéreuses (colon, cellules gliales) et sur des modèles murins souffrant de tumeurs pancréatiques (Kruszewski *et al.*, 2004; Yanamandra *et al.*, 2004; Gocheva *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006; Gocheva *et al.*, 2010).

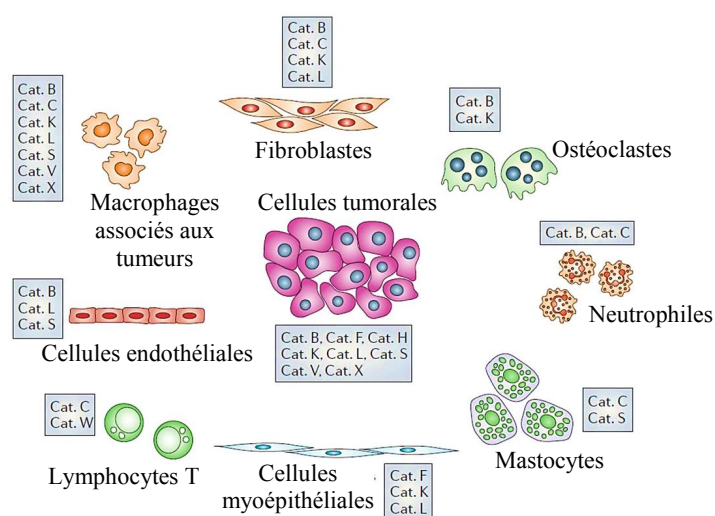


Figure 14 : Profil d'expression des cathepsines à cystéine dans le microenvironnement tumoral (illustration issue de Mohamed & Sloane, 2006)

1.3.2.5. Autres pathologies

Les cathepsines K, S et L sont associées à l'obésité, notamment via leur implication dans la régulation de l'adipogenèse. La cathepsine K est surexprimée dans les tissus adipeux d'individus obèses et son inhibition diminue la différenciation des pré-adipocytes en adipocytes (Yang *et al.*, 2008). Son rôle serait lié à la dégradation de la fibronectine, qui est un régulateur naturel de la différenciation adipocytaire, et du collagène I (Spiegelman & Ginty, 1983; Yang *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2009). De la même manière, la cathepsine S serait impliquée dans la stimulation de l'adipogenèse et sa surexpression est corrélée avec l'augmentation de l'indice de masse corporelle (IMC) chez des patients obèses (Taleb & Clément, 2007).

Les cathepsines sont impliquées dans certaines pathologies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer. Cette pathologie est caractérisée par une perte de la mémoire et la formation au niveau cérébral de plaques β -amyloïdes neurotoxiques. Cette plaque se forme à partir de peptides β -amyloïdes générés à partir de leur précurseur sous l'action de protéases appelées β - et γ -sécrétases. La cathepsine B a été proposée comme une β -sécrétase potentielle (Hook *et al.*, 2005). L'utilisation d'inhibiteurs synthétiques de la cathepsine B ainsi que l'invalidation génétique de l'enzyme sur un modèle murin d'Alzheimer améliore les capacités de mémoire et diminue de façon significative la formation de plaques β -amyloïdes au niveau du tissu cérébral (Hook *et al.*, 2008; Kindy *et al.*, 2012). Un inhibiteur pharmacologique de la cathepsine B est actuellement en cours de développement dans le cadre de cette pathologie (**Tableau 4**).

1.4. Les cathepsines à cystéine dans les pathologies pulmonaires

1.4.1. L'inflammation pulmonaire

1.4.1.1. Généralités

Les poumons permettent les échanges gazeux entre l'environnement extérieur et l'organisme et assurent l'oxygénation du sang au niveau des alvéoles pulmonaires. L'épithélium pulmonaire est en contact direct avec le milieu extérieur et donc constamment exposé à plusieurs types d'agressions comme les micro-organismes (bactéries, champignons, virus), les polluants (microparticules, nanoparticules, fumée de cigarette, agents oxydants) et les allergènes (acariens, pollen). Le tissu pulmonaire dispose de plusieurs moyens de défense

contre ces agressions comme les défenses mécaniques (sécrétion de mucus, clairance mucociliaire), les défenses immunitaires innées (cellules phagocytaires, peptides et protéines antimicrobiens) et les défenses immunitaires adaptatives (IgA sécrétoires). La sollicitation des défenses pulmonaires entraîne la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-8, TNF- α) par les cellules de l'immunité (neutrophiles, macrophages, lymphocytes T) aboutissant à l'inflammation transitoire du tissu pulmonaire. Cependant cette réaction inflammatoire peut persister et devenir incontrôlable, entraînant une sécrétion massive d'enzymes protéolytiques susceptibles de dégrader les protéines de la matrice extracellulaire et d'inactiver les peptides et protéines antimicrobiens. Ce phénomène se retrouve dans diverses pathologies pulmonaires d'origine génétique comme la mucoviscidose, ou environnementales comme la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO), l'asthme, la fibrose ou la silicose.

1.4.2. Le stress oxydatif

L'inflammation pulmonaire est souvent associée à une perturbation de l'équilibre entre les systèmes oxydants et antioxydants. Parmi les oxydants, les espèces réactives de l'oxygène ou ROS (*reactive oxygen species*) et les espèces réactives de l'azote ou RNS (*reactive nitrogen species*) sont les plus représentatives. Les antioxydants comptent le glutathion (GSH) et tout un arsenal d'enzymes de détoxification comme par exemple la catalase, la superoxyde dismutase (SOD) ou encore la glutathion peroxydase.

1.4.2.1. Oxydants exogènes

La fumée de cigarette constitue la principale source d'agents oxydants exogènes retrouvés dans le poumon, aux côtés des polluants atmosphériques comme l'ozone (O₃), le dioxyde d'azote (NO₂) le dioxyde de soufre (SO₂) et des nanoparticules comme l'oxyde de cérium (CeO₂) et le dioxyde de titane (TiO₂) qui rentrent dans la composition de nombreux produits de la vie courante (MacNee, 2000; Lu *et al.*, 2014). Les agents oxydants sont susceptibles de provoquer des lésions directes du tissu pulmonaire et de stimuler la réaction inflammatoire. La fumée de cigarette est un mélange complexe contenant près de 10¹⁴ radicaux libres par bouffées comme les radicaux alkoxyl (RO $\cdot$), peroxy (RO₂ $\cdot$) et semiquinone (Q $\cdot$) (Pryor & Stone, 1993). La phase gazeuse contient également des oxydants hautement réactifs à courte durée de vie comme l'anion superoxyde (O₂ $\cdot^-$) et le monoxyde d'azote (NO), tous deux capables de réagir ensemble pour générer des peroxy-nitrites (ONOO $\cdot$). Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) peut être généré à partir de la réaction entre de l'anion superoxyde et le

radical hydroxyl ($\text{OH}\cdot$) (réaction d'Haber-Weiss) (Nakayama *et al.*, 1989; Zang *et al.*, 1995). A l'inverse, l' H_2O_2 peut réagir avec des ions métalliques présents dans la fumée de cigarette comme les ions ferreux (Fe^{2+}) pour former des radicaux hydroxyl (réaction de Fenton). L'ozone (O_3) est issu de la réaction entre des gaz précurseurs dégagés par la combustion de carburants automobiles (oxydes d'azote, résidus volatiles d'hydrocarbures) et l'oxygène atmosphérique sous l'influence des rayonnements UV solaires. Il constitue un polluant atmosphérique majeur et est un oxydant puissant qui stimule le recrutement et la rétention des neutrophiles au niveau du poumon et altère les fonctions pulmonaires puisqu'il diminue la valeur du volume maximale expiré en une seconde (VEMS) de 7% environ chez des individus sains (Nightingale *et al.*, 1999).

1.4.2.2. Oxydants endogènes et systèmes antioxydants

Au niveau du poumon, les neutrophiles, les macrophages et les pneumocytes de type II produisent des agents oxydants comme l'anion superoxyde lui-même responsable de la formation d'autres ROS et RNS (**Figure 15**) (Hubbard *et al.*, 1987; Wallaert *et al.*, 1993; Morrison *et al.*, 1999; Owen, 2005). Au niveau moléculaire, l' O_2 non métabolisé au niveau de la chaîne respiratoire (2 à 3% à l'état basal) est converti en anion superoxyde O_2^- sous l'action de la NADPH oxydase (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase* ou NOX) et de la xanthine oxydase, et peut provoquer des dommages oxydatifs (exemple : la lipopéroxydation des phospholipides membranaires ou l'apoptose). L' O_2 peut se transformer également en H_2O_2 sous l'action de la SOD. La NO synthase de type 2 (NOS-2) catalyse à partir de la L-arginine la production du monoxyde d'azote NO qui réagit avec le O_2^- pour former des peroxy-nitrites (Pechkovsky *et al.*, 2002). D'autres oxydants peuvent être générés par les cellules comme l'acide hypochloreux (HOCl) produit par la myéloperoxydase des neutrophiles et les radicaux hydroxyles $\text{OH}\cdot$ obtenus après la réaction entre les ions Fe^{2+} libérés par les macrophages et le H_2O_2 . Les systèmes antioxydants sont présents au niveau intracellulaire comme le glutathion (GSH) et extracellulaire comme la SOD, la catalase ou les glutathion peroxydase et glutathion oxydase (Cross *et al.*, 1994). D'autres systèmes antioxydants protéiques non enzymatiques (appelés *scavengers*) existent comme l'albumine et les mucines dont la séquence est riche en fonctions oxydables comme les thiols libres.

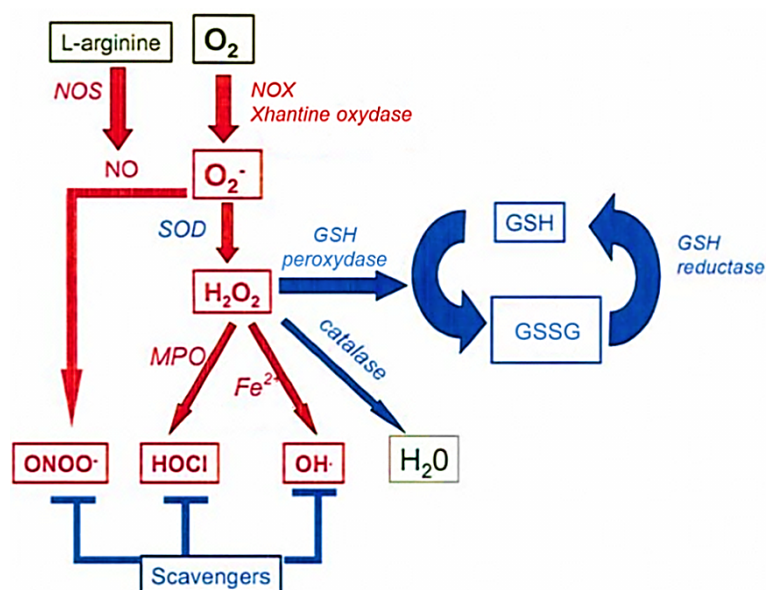


Figure 15 : Régulation des systèmes oxydants et antioxydants pulmonaires

Les systèmes oxydants sont en rouge et les systèmes antioxydants sont en bleu. GSH : glutathion réduit ; GSSG : glutathion oxydé ; MPO : myéloperoxydase ; NOX : NADPH oxydase ; NO : oxyde d'azote ; NOS : NO synthase ; SOD : superoxyde dismutase. (illustration extraite de Owen, 2005).

1.4.2.3. Le stress oxydatif dans l'inflammation pulmonaire

La production excessive de ROS et de RNS survenant lors de pathologies inflammatoires pulmonaires comme la mucoviscidose et la BPCO, participe à l'entretien de l'inflammation au niveau des poumons (Barnes, 2004; Ziady & Hansen, 2014). Le stress oxydatif contribue à augmenter la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α et l'IL-8 par les cellules épithéliales et les macrophages, notamment par stimulation de la voie NF κ B (Macnee & Rahman, 1999). Il a été montré *in vitro* qu'une matrice constituée de collagène IV déposée sur une lamelle de verre et dénaturée par des agents oxydants présents dans la fumée de cigarette, comme l'acroléine, stimule l'adhésion des macrophages via le récepteur SRA (*scavenger receptor A*) (Kirkham *et al.*, 2003). La stimulation du récepteur SRA entraîne la sécrétion par les macrophages adhérents du facteur chimioattractant MCP-1 (*monocytes chemoattractant protein-1*) et de ROS comme l'acide hypochloreux. Les macrophages pulmonaires de patients atteints de BPCO sécrètent d'importantes quantités de protéases comme la MMP-9, qui participent au remodelage de la matrice extracellulaire, associé à l'inflammation pulmonaire (Russell *et al.*, 2002). Le stress oxydatif aurait également un impact sur le déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases qui est un autre phénomène lié aux pathologies pulmonaires inflammatoires. Des inhibiteurs de protéases comme l' α 1-antitrypsine (AAT), le SLPI ou le TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) oxydés au niveau de résidus méthionine par des agents oxydants comme l'ozone, les peroxy-nitrites, le

péroxyde d'hydrogène ou encore l'acide hypochloreux perdent leurs propriétés inhibitrices vis-à-vis de l'HNE, de la CatG et de la MMP-9 (Dooley & Pryor, 1982; Johnson, 1987; Heinzl-Wieland *et al.*, 1991; Cavarra *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007).

1.4.3. La balance protéases/antiprotéases

1.4.3.1. Origine et concept

L'hypothèse selon laquelle le remodelage de la matrice extracellulaire observé lors de pathologies inflammatoires pulmonaires serait dû à un déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases est née il y a environ une cinquantaine d'année (pour revue : Turino, 2002). Une première étude réalisée en 1963 a montré que des individus atteints de déficience congénitale en α 1-antitrypsine (AAT), un inhibiteur de l'élastase de neutrophile (HNE), présentent un emphysème pulmonaire précoce, non lié au tabagisme (Laurell & Eriksson, 1963). Ce n'est que plus tard qu'un lien fut établi entre le déficit en AAT et l'activité protéolytique excessive dans les poumons de patients atteints d'emphysème (Snider, 1992). Bien que la majeure partie des études se soient focalisées sur le rôle de l'HNE dans l'emphysème, il est clair aujourd'hui que d'autres protéases comme les MMPs et les cathepsines à cystéine sont également impliquées dans ce processus.

1.4.3.2. Les protéases de l'inflammation pulmonaire et leurs inhibiteurs

Les protéases exprimées au niveau du poumon sont principalement exprimées par les cellules immunitaires comme les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes (Barnes, 2004). Les neutrophiles sécrètent des protéases à sérine comme l'HNE, la cathepsine G (Cat G), la protéase-3 (Pr3) et la protéase-4 (*neutrophil serine proteinase 4*, NSP-4) découverte plus récemment (Sallenave & Shapiro, 2008; Perera *et al.*, 2012). Elles sont stockées dans les granules des neutrophiles et libérées dans le milieu extracellulaire sous l'action de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8 ou le TNF- α (Owen *et al.*, 1997). L'activité protéolytique des protéases à sérine de neutrophile est contrôlée par leurs inhibiteurs endogènes : l'AAT, le SLPI, la trappine-2, l'élafine et le MNEI (*monocyte/neutrophil elastase inhibitor*) (Cooley *et al.*, 2001; Korkmaz *et al.*, 2010). De fortes concentrations de protéases à sérine sont retrouvées dans les fluides bronchiques lors de pathologies pulmonaires inflammatoires comme la mucoviscidose ou la BPCO (10^{-9} à 10^{-7} M) (Korkmaz *et al.*, 2010). L'HNE est l'une des protéases bien décrites dans ce type de pathologie. Outre son rôle dans la dégradation des constituants de la matrice extracellulaire, elle participe à l'entretien de l'inflammation en

participant à la maturation de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, -2, -6, TNF- α) et de zymogènes issus d'autres classes de protéases comme la pro-cathepsine B ou les pro-MMP-2, -7 et -9 (Garcia-Verdugo *et al.*, 2010). Les MMPs sont des protéases dont l'activité dépend d'un atome de zinc (Zn²⁺) et sont classées en quatre groupes en fonction de leur structure et de leur spécificité de substrat (pour revue : Rodríguez *et al.*, 2010). Les MMPs comprennent les collagénases (MMP-1, -8, -13 et -18), les gélatinases (MMP-2 et -9), les stromélysines (MMP-3, -10, -11 et -27) et les matrilysines (MMP-7 et -26). Il existe un cinquième groupe comprenant les MT-MMPs (*membrane-type matrix metalloproteinases*, MT-MMP-14 à -17, MT-MMP-24 et -25). D'autres métalloprotéases sont associées aux membranes des macrophages : les ADAMs (*A Disintegrin and A Metalloproteinase domain*) constituées d'un domaine désintégrine (ligand des intégrines) et d'un domaine métalloprotéase (Dreymueller *et al.*, 2015). Les inhibiteurs naturels des MMPs sont les TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*), il en existe trois chez l'homme (TIMP-1 à -3). L'activité des MMPs est également contrôlée par l' α -2 macroglobuline qui est un inhibiteur non spécifique. Dans le poumon, les MMPs sont principalement sécrétées par les macrophages, en particulier les MMP-1, -2, -9 et -12 (Shapiro *et al.*, 1991). Le rôle des MMP-2, -9 et -12 dans l'inflammation pulmonaire et le remodelage de la matrice extracellulaire a été particulièrement étudié sur des modèles murins et lors d'études cliniques chez l'être humain (Parks *et al.*, 2004; Sagel *et al.*, 2005; Gaggar *et al.*, 2011; Trojanek *et al.*, 2014). De la même manière que l'HNE, les MMPs (en particulier la MMP-9) participent à la maturation de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-8 et le TNF- α (Van den Steen *et al.*, 2000; Churg *et al.*, 2003). Aux côtés des protéases à sérine et des MMPs, les cathepsines à cystéine sont également impliquées dans l'inflammation pulmonaire.

1.4.4. Les cathepsines à cystéine dans l'inflammation pulmonaire

1.4.4.1. Localisation pulmonaire des cathepsines à cystéine

Les cathepsines à cystéine pulmonaires B, H, L et X sont exprimées de façon ubiquitaire dans le poumon (Bühling *et al.*, 2004a) (**Figure 16**). Les cathepsines B, H, K, L et S sont présentes dans les cellules épithéliales bronchiques et les macrophages alvéolaires, les cathepsines W et X sont majoritairement localisées dans les macrophages et les cathepsines C et H sont présentes dans les pneumocytes de type II (**Tableau 6**) (Chapman *et al.*, 1994; Bühling *et al.*,

1999; Bühling *et al.*, 2004a; Lecaille *et al.*, 2008). La cathepsine W est également exprimée dans les lymphocytes (Bühling *et al.*, 2004a).

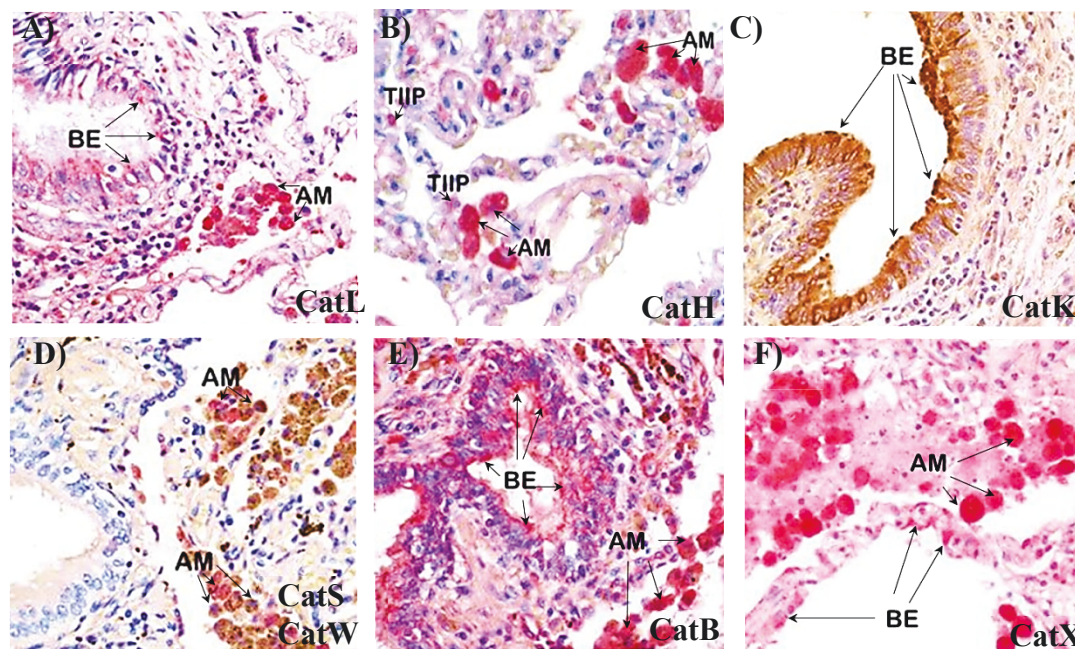


Figure 16 : Détection des cathepsines B, L, H, K, S, W et X pulmonaires

Détection par immuno-histochimie sur du tissu pulmonaire humain A) de la cathepsine L (en rose) dans l'épithélium bronchique (BE), B) de la cathepsine H (en rose) dans les pneumocytes de type II (TIIP) et dans les macrophages alvéolaires (AM), C) de la cathepsine K (en marron) dans le BE, D) des cathepsines S (en marron) et W (en rose) dans les AM. E) de la cathepsine B dans le BE et les AM et F) de la cathepsine X dans le BE et les AM (illustrations extraites de Bühling *et al.*, 2004a).

Tableau 6 : Expression des cathepsines à cystéine pulmonaires
(d'après Kasabova *et al.*, 2011)

Cathepsine	Localisation cellulaire
B	Ubiquitaire, cellules épithéliales bronchiques, macrophages
C	Pneumocytes de type II
F	Macrophages alvéolaires murins
H	Ubiquitaire, Pneumocytes de type II, macrophages
K	Macrophages, cellules épithéliales bronchiques
L	Ubiquitaire, cellules épithéliales bronchiques, macrophages
S	Macrophages, cellules épithéliales bronchiques
X	Ubiquitaire, macrophages
W	Macrophages, Lymphocytes

1.4.4.2. Rôle des cathepsines dans le déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases

L'équilibre de la balance protéases/antiprotéases est perturbé à la fois par la sécrétion massive des protéases et aussi par l'inactivation de leurs inhibiteurs endogènes. L'HNE est capable de

stimuler l'expression de la MMP-2 et de la cathepsine B par les macrophages (Geraghty *et al.*, 2007a). Les cathepsines B, L et S clivent le SLPI et inactivent sa propriété inhibitrice de protéases à sérine, ce qui favorise l'activité de l'HNE dans l'emphysème pulmonaire (Taggart *et al.*, 2001). La cathepsine L dégrade l'AAT *in vitro* au niveau de son domaine inhibiteur, cependant cette observation reste encore à démontrer *in vivo* (Johnson *et al.*, 1986). La cathepsine B contribuerait à augmenter l'activité des MMPs puisqu'elle est capable d'hydrolyser *in vitro* les TIMP-1 et -2 (Kostoulas *et al.*, 1999). L'activité des cathepsines à cystéine peut être favorisée par l'HNE qui d'une part participe à la maturation de la pro-cathepsine B, et d'autre part dégrade et inactive la cystatine C (Abrahamson *et al.*, 1991; Buttle *et al.*, 1991). Enfin, la cathepsine B est capable de cliver *in vitro* le kininogène de haut poids moléculaire (HMWK) (Naudin *et al.*, 2010). Il a été montré que HMWK est dégradé dans des expectorations issues de patients atteints de silicose (Perdereau *et al.*, 2006) et de mucoviscidose (Naudin *et al.*, 2011) dans lesquelles l'expression et l'activité des cathepsines B et L sont majoritaires comparées aux cathepsines H, K et S.

1.4.4.3. La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO)

1.4.4.3.1 Définition

La BPCO est une pathologie d'intérêt majeur de santé publique puisqu'elle sera selon l'OMS la 3^{ème} cause de décès dans le monde d'ici 2020 après les accidents vasculaires cérébraux et les pathologies cardiaques et qu'il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement curatif. Selon la définition du GOLD (*Global initiative for chronic Obstructive Lung Diseases*), elle est caractérisée par une obstruction progressive et irréversible des voies respiratoires, associée à une inflammation bronchique chronique en réponse à l'inhalation de gaz ou de particules toxiques (<http://www.goldcopd.org>). La BPCO est majoritairement associée au tabagisme (90%) et touche principalement des patients dont l'âge est compris entre 45 et 70 ans (Fletcher *et al.*, 2011). Le stress oxydatif induit par la fumée de cigarette va stimuler la sécrétion de médiateurs de l'inflammation (comme l'IL-8 par exemple) par les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires (pour revue : Barnes, 2004). Les macrophages, les neutrophiles et les lymphocytes recrutés suite à l'inflammation sécrètent des quantités importantes d'enzymes protéolytiques (protéases à sérine, MMPs et protéases à cystéine) qui vont participer à la dégradation des constituants de la matrice extracellulaire (collagènes, élastine) et au développement de l'emphysème pulmonaire associé à la BPCO (Owen, 2005). Les cellules épithéliales vont sécréter des facteurs de croissance comme le TGF- β 1 qui va

stimuler la production de collagènes par les fibroblastes et provoquer une fibrose bronchique (Takizawa *et al.*, 2001). L'inflammation du tissu pulmonaire provoque également une hypersécrétion de mucus qui contribue à réduire la clairance muco-ciliaire et à favoriser l'obstruction des bronches (Kim & Criner, 2013). Le diagnostic clinique de la BPCO s'effectue par spirométrie, un examen médical qui consiste à mesurer le volume maximal à la 1^{ère} seconde après une expiration forcée (VEMS) et la capacité vitale forcée (CVF) après administration d'un bronchodilatateur (Casaburi & ZuWallack, 2009) (**Figure 17**).

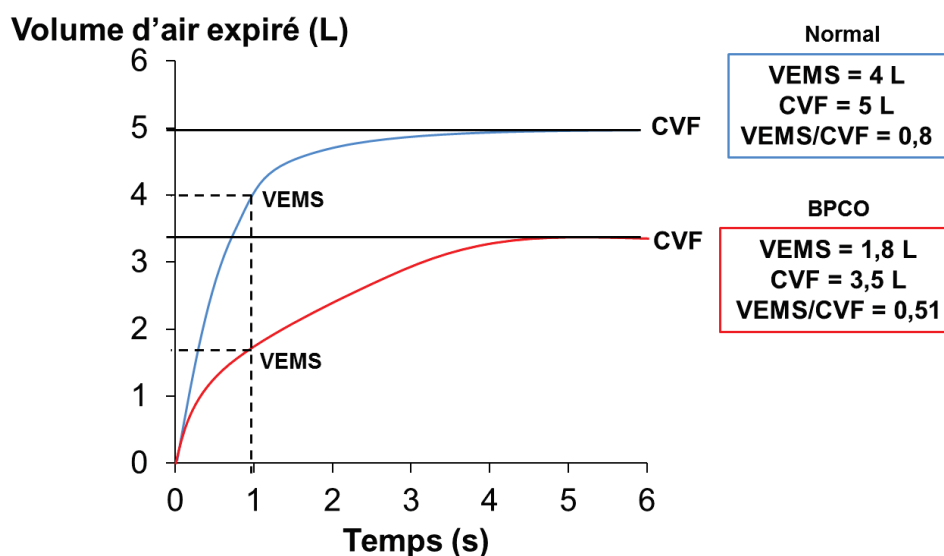


Figure 17: Exemple de courbes volume-temps obtenues par spirométrie

La courbe obtenue chez un patient sain est en bleu, celle obtenue chez un patient atteint de BPCO est en rouge (<http://www.goldcopd.org>).

La BPCO est diagnostiquée chez un patient dont la valeur du ratio VEMS/CVF est inférieure à 0,70. Ensuite, le degré de sévérité de la pathologie est évalué en comparant le VEMS obtenu chez le patient à une valeur théorique de VEMS définie par des standards basés sur l'âge, le sexe, la taille et l'origine ethnique du patient. La valeur du ratio $VEMS_{\text{patient}}/VEMS_{\text{standard}}$, exprimée en %, permet de distinguer quatre stades de sévérité de la BPCO, classés de GOLD I à GOLD IV (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Classification clinique de la BPCO selon le degré de sévérité (GOLD).
(d'après Casaburi & ZuWallack, 2009).

Sévérité	Valeur de VEMS associée (% de la valeur standard)
GOLD I : légère	$VEMS \geq 80\%$
GOLD II : modérée	$50\% \leq VEMS < 80\%$
GOLD III : sévère	$30\% \leq VEMS < 50\%$
GOLD IV : très sévère	$VEMS < 30\%$ $VEMS < 50\%$ associé à une insuffisance respiratoire grave

Les patients souffrant de BPCO présentent dans certains cas une forme exacerbée de la pathologie qui est une aggravation aigüe temporaire des symptômes respiratoires (dyspnée, toux, expectorations) et de l'inflammation pulmonaire associée à une infection bactérienne ou virale. Les bactéries le plus souvent à l'origine des phases d'exacerbation sont *M. catarrhalis*, *H. influenzae*, et *S. pneumoniae* (Murphy, 2006). Les exacerbations d'origine virale sont surtout causées par des rhinovirus et les co-infections bactériennes et virales sont de plus en plus fréquentes dans ce phénomène (Papi *et al.*, 2006).

1.4.4.3.2 Traitements

Le sevrage tabagique fait partie des premières mesures adoptées pour diminuer les symptômes de la BPCO, et il est régulièrement associé avec des substituts à la nicotine comme le bupropion pour calmer les sensations de dépendance (Jorenby *et al.*, 1999; Tashkin *et al.*, 2001; Tashkin *et al.*, 2001). Cependant, 30% des patients parviennent à un sevrage durable avec ce type de stratégie. Les traitements pulmonaires de la BPCO regroupent principalement des bronchodilatateurs administrés par inhalation comme les agonistes β 2-adrénergiques à longue durée d'action (formotérol, indacatérol) qui permettent la décontraction des muscles lisses bronchiques et ainsi l'augmentation du diamètre des voies respiratoires (Cazzola & Donner, 2000; Sturton *et al.*, 2008). Il existe également d'autres principes actifs agissant sur la dilatation des bronches comme les antagonistes cholinergiques muscariniques tels que le bromure de tiotropium ou le bromure d'aclidinium (Joos, 2010). Les bronchodilatateurs sont régulièrement associés avec des anti-inflammatoires, notamment des corticostéroïdes comme la fluticasone ou le budésonide de façon à réduire l'inflammation et les risques d'exacerbation (Mahler *et al.*, 2002; Szafranski *et al.*, 2003). D'autre part, les stratégies thérapeutiques à bases d'antioxydants comme les composés contenant des thiols (N-acétylcystéine, carbocystéine, glutathion), les vitamines antioxydantes (vitamines E et C), les compléments alimentaires à base de polyphénols (curcumine, resvératrol) présentent les mêmes bénéfices thérapeutiques que les corticostéroïdes (pour revue : Fischer *et al.*, 2015). A l'heure actuelle, il existe un seul traitement à base d'antiprotéase: le Prolastin® (AAT recombinant), qui contribue à ralentir la progression de l'emphysème lié à l'activité de l'HNE. Des inhibiteurs synthétiques ciblant à la fois les MMP-9 et -12 (AZD1236 et AZD11557272), un inhibiteur sélectif de la MMP-12 (MMP408) et un inhibiteur sélectif de l'HNE (AZD9668) sont actuellement en cours d'essais pré-clinique chez le rongeur (Churg *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; Stevens *et al.*, 2011; Dahl *et al.*, 2012). Enfin, des stratégies d'administration par aérosols d'inhibiteurs recombinants des protéases à sérine de neutrophiles (HNE, Pr3 et CatG)

comme le SLPI et la trappine-2 sont également en cours d'étude (pour revue: Zani *et al.*, 2011).

1.4.4.3.3 Les cathepsines dans la BPCO

L'activité de type cathepsine B est supérieure dans les lavages bronchoalvéolaires (LBA) de patients fumeurs atteints de BPCO comparativement à des individus non-fumeurs (Chang *et al.*, 1986). Comme décrit précédemment, l'HNE qui est surexprimée chez les patients BPCO, contribue à son expression et à son activité en maturant la procathepsine B et en clivant la cystatine C. Ce mécanisme est « auto-entretenu » par l'inactivation du SLPI par les cathepsines B, L et S, favorisant ainsi l'activité de l'HNE (Abrahamson *et al.*, 1991; Buttle *et al.*, 1991; Taggart *et al.*, 2001). Tout ceci contribuerait à l'emphysème pulmonaire décrit chez les patients atteints de BPCO. L'expression et l'activité de la cathepsine L sont augmentées dans les LBA de patients fumeurs emphysemateux, de plus, les lysats de macrophages issus de patients fumeurs présentent une activité élastinolytique sept fois plus importante comparée à celle de lysats issus de patients non-fumeurs (Reilly *et al.*, 1991; Takeyabu *et al.*, 1998). La cathepsine L pourrait être impliquée dans la dégradation de l'élastine pulmonaire lors de l'emphysème. D'autre part, la diminution des taux de collagènes et d'élastine pulmonaires dans un modèle de cobaye emphysemateux est positivement corrélée avec l'augmentation de l'expression et de l'activité de la cathepsine K (Golovatch *et al.*, 2009). Durant la même étude, cette corrélation a été confirmée par immuno-histochimie sur des tissus pulmonaires provenant de patients atteints de BPCO, suggérant ainsi son rôle dans la dégradation du parenchyme pulmonaire. Les cathepsines B, H, K, L et S et la MMP-12 sont surexprimées dans des modèles murins transgéniques de BPCO induite par une surexpression en IFN- γ ou IL-13 (Zheng *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). Ces souris préalablement traitées avec des inhibiteurs pharmacologiques de ces protéases sont protégées de l'emphysème pulmonaire. De plus, la sécrétion de la cathepsine S par les macrophages humains (cellules U937) incubés dans des LBA de patients atteints de BPCO est bloquée par des anticorps dirigés spécifiquement contre l'IFN- γ (Geraghty *et al.*, 2007b). Ainsi, le contrôle de l'expression pulmonaire de la cathepsine S dans la BPCO semble être majoritairement dépendant de l'IFN- γ , corroborant d'autres travaux réalisés sur d'autres types cellulaires (cellules musculaires lisses, cellules endothéliales) (Sukhova *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2003).

Il a été montré sur des modèles de souris transgéniques, déficientes en cathepsine K, une fibrose pulmonaire plus importante après instillation intratrachéale de bléomycine en

comparaison à des souris contrôles (Bühling *et al.*, 2004b). Ainsi, la fibrose liée à la BPCO pourrait être due à une diminution de l'activité collagénolytique de la cathepsine K. D'autre part, le TGF- β qui est un facteur pro-fibrotique diminue l'expression de la cathepsine K dans un modèle murin de fibrose induite par la silice (van den Brûle *et al.*, 2005). Le stress oxydatif associé à la BPCO module l'expression des cathepsines, ainsi la fumée de cigarette augmente l'expression des cathepsines B et S macrophagiques, via IL-18 (Kang *et al.*, 2007). De plus, l'expression de la cathepsine S est augmentée dans un modèle de souris traitées à l'ozone et son inhibition réduit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6) et l'infiltration pulmonaire des neutrophiles induite par l'oxydant (Williams *et al.*, 2009). La cathepsine S constituerait ainsi une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de l'inflammation pulmonaire liée au stress oxydatif.

1.4.4.1. La mucoviscidose

1.4.4.1.1 Définition

La mucoviscidose est une maladie génétique autosomale récessive dont la prévalence est estimée à une naissance sur 3700 aux Etats-Unis et à une naissance sur 2500 en Europe (Yang & Ma, 2015). Cette pathologie est causée par la mutation d'un gène situé au niveau du chromosome 7 et qui code une glycoprotéine (~180 kDa) appelée CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane regulator*) (Riordan *et al.*, 1989). Le CFTR est un canal transmembranaire de la famille des ABC-transporteurs (*ATP binding cassette*) exprimé de façon ubiquitaire au niveau du pôle apical des cellules épithéliales (Trezise & Buchwald, 1991). Ce canal assure le passage vers le milieu extracellulaire des ions Cl^- , HCO_3^- et SCN^- . Le transport d'ions Cl^- par le canal CFTR influence les mouvements d'eau entre le milieu intracellulaire et extracellulaire et contribue ainsi à l'hydratation des muqueuses (Frizzell & Hanrahan, 2012). Il existe plus de 1900 mutations du gène CFTR aboutissant à une diminution ou une perte de la fonction du canal (Rogan *et al.*, 2011). Ces mutations peuvent entraîner une terminaison précoce de la traduction de l'ARN messager ou encore un défaut d'adressage, d'activation, de conductance ou de stabilité du canal CFTR. La délétion de la phénylalanine en position 508 du CFTR (ΔF508) est la mutation la plus courante puisqu'elle concerne près 90% des cas (Riordan, 2008). La mutation ΔF508 provoque un défaut de repliement du CFTR et empêche son adressage correct à la surface des cellules épithéliales. Au niveau pulmonaire, les patients atteints de mucoviscidose présentent un mucus bronchique plus épais lié au manque d'hydratation de la muqueuse bronchique (Donaldson *et al.*, 2006). De plus, l'augmentation

des concentrations pulmonaires en ADN, mucines et actine filamenteuse rend le mucus bronchique plus visqueux (Vasconcellos *et al.*, 1994; Marcos *et al.*, 2010; Henderson *et al.*, 2014). Il en résulte une obstruction des bronches, associée à une diminution significative de la clairance muco-ciliaire ce qui favorise la colonisation du tissu pulmonaire par plusieurs bactéries pathogènes telles que *P. aeruginosa* (~80% des patients colonisés) *S. aureus* (~40% des patients colonisés), *H. influenzae* ou *B. cepacia* (~5% des patients colonisés) (Cystic Fibrosis Foundation Patient Registry Annual Report, 2009). L'infection chronique de l'épithélium pulmonaire aboutit au recrutement de cellules de l'immunité comme les neutrophiles et les macrophages et au relargage de protéases, comme l'HNE, impliquées dans la destruction progressive du parenchyme pulmonaire (Hartl *et al.*, 2012).

1.4.4.1.2 Traitements

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitements curatifs contre la mucoviscidose et l'espérance de vie des patients est d'environ 40 ans. La majorité des traitements comprennent des mucolytiques qui vont fluidifier le mucus bronchique comme la N-acétylcystéine (NAC) ou la dornase alpha (DNase recombinante, Pulmozyme®) ainsi que des solutions salines hypertoniques et du mannitol permettant la réhydratation de l'épithélium pulmonaire, l'ensemble permettant de rétablir la clairance muco-ciliaire (Fuchs *et al.*, 1994; Elkins *et al.*, 2006; Jaques *et al.*, 2008). Les patients reçoivent également plusieurs types d'antibiotiques comme les aminosides (tobramycine), les β -lactamines (aztréonam), les fluoroquinolones (ciprofloxacine) ou les polymyxines (colistine) pour limiter ou prévenir les infections bactériennes (Høiby & Koch, 1990; Ramsey *et al.*, 1993; Retsch-Bogart *et al.*, 2009). Outre le traitement des symptômes, la transplantation pulmonaire constitue une autre alternative thérapeutique, le taux de survie à 1 an et à 3 ans après chirurgie en Europe est de 84,3% et de 69,3% respectivement (The International Society for Heart and Lung Transplantation, Transplant Registry 2010). Ce n'est que plus récemment que des traitements à base de molécules chimiques (dérivés cyclopropanes et carboxamides) appelés correcteurs du canal CFTR ont fait l'objet d'essais cliniques (pour revue : Yang & Ma, 2015). Parmi ces composés, le VX-770 (Kalydeco®, Vertex Pharmaceuticals, États-Unis) qui améliore la conductance du canal CFTR chez les malades porteurs de la mutation G551D, a obtenu son autorisation de mise sur le marché par l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé) en France en 2012. Le VX-770 combiné avec le VX-809, un autre correcteur du canal CFTR qui améliore le repliement et l'adressage du

canal, est actuellement en essais cliniques de phase II chez les patients homozygotes porteurs de la mutation $\Delta F508$ (Pettit & Fellner, 2014).

1.4.4.2. Les cathepsines dans la mucoviscidose

Les cathepsines B, L et S sont présentes sous forme active dans les LBA de patients atteints de mucoviscidose (CF) et dans des quantités environ 100 fois supérieures à celles issues de volontaires non CF (Taggart *et al.*, 2003). Cependant, leur expression n'est pas modifiée en fonction du degré de colonisation par *P. aeruginosa*, et ne constituent pas de marqueur de l'infection par *P. aeruginosa* contrairement à l'IL-8 et l'HNE (Martin *et al.*, 2010; Naudin *et al.*, 2011). L'activité des cathepsines à cystéine serait favorisée par l'acidification des fluides alvéolaires et bronchiques (pH compris entre 5 et 6) (Tate *et al.*, 2002; Berkebile & McCray, 2014). Les LBA d'enfants atteints de mucoviscidose non colonisés par *P. aeruginosa* présentent des concentrations en cathepsine S plus élevées par rapport aux LBA issus d'enfants non CF souffrant d'infections pulmonaires récurrentes (majoritairement à *H. influenzae*) (Weldon *et al.*, 2014). Il a été montré que mir31, un micro-ARN qui inhibe l'expression du facteur de transcription IRF-1 (*interferon regulatory factor-1*), est diminuée chez les patients atteints de mucoviscidose, aboutissant à la surexpression de la cathepsine S en réponse à la stimulation par l'IFN- γ . De façon intéressante, malgré la présence de ROS et une réduction du potentiel antioxydant observée dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose, les cathepsines à cystéine restent actives dans cet environnement oxydant à priori défavorable pour leur activité (Owen, 2005; Hervé-Grépinet *et al.*, 2008; Godat *et al.*, 2008). La cystéine du site actif peut se trouver sous un état oxydé irréversible (acide sulfonique, $-\text{SO}_3\text{H}$) ou réversible (acide sulfénique, $-\text{SOH}$) (voir chapitre 1.2.3). La présence de cathepsines sous forme d'acide sulfénique pourrait expliquer la préservation de leur activité dans un milieu oxydant. En plus de participer à l'inflammation pulmonaire, les cathepsines à cystéine sont impliquées dans l'inactivation des défenses antimicrobiennes en dégradant plusieurs peptides et protéines antimicrobiens (AMPs) notamment dans la mucoviscidose (voir chapitre suivant).

1.4.4.3. Les cathepsines dans d'autres pathologies pulmonaires

Les cathepsines à cystéine sont impliquées dans d'autres pathologies comme l'asthme, la fibrose, la silicose ou encore la sarcoïdose. Le rôle des cathepsines dans l'asthme est peu documenté, seule la cathepsine S serait un biomarqueur potentiel de la maladie (Layton *et al.*, 2001; Small *et al.*, 2011). La cathepsine S est impliquée dans l'inflammation allergique

pulmonaire et son inhibition pharmacologique bloque le recrutement et l'infiltration des éosinophiles au niveau du poumon (Riese *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2009). Outre la cathepsine S, les cathepsines K et F seraient impliquées dans l'asthme, cependant leur rôle précis dans le mécanisme physiopathologique de la maladie reste encore à étudier (Somoza *et al.*, 2002; Faiz *et al.*, 2013). Les cathepsines B, H, K L, et S sont présentes et actives dans des LBA issus de patients atteints de silicose et de sarcoïdose (Serveau-Avesque *et al.*, 2006; Perdereau *et al.*, 2006). La silicose est une maladie inflammatoire pulmonaire chronique causée par l'exposition prolongée (plusieurs années) à des particules de silices, et la sarcoïdose est une maladie granulomateuse caractérisée par l'accumulation alvéolaire de cellules de l'immunité (lymphocytes, macrophages, cellules dendritiques) en réponse à un antigène non connu (Baughman *et al.*, 2011; Laney & Weissman, 2014). Les concentrations en cathepsines actives dans des échantillons de patients atteints de silicose sont environ 10 fois plus importantes que celles retrouvées chez des individus sains, les cathepsines B et L étant majoritaires par rapport aux autres cathepsines (Perdereau *et al.*, 2006). Les cathepsines à cystéine contribuent également au développement de la fibrose pulmonaire, notamment en stimulant la différenciation fibroblastique. Une étude récente réalisée au sein de notre équipe a montré que l'activité intracellulaire de cathepsine B est impliquée dans la différenciation des fibroblastes dépendante du TGF- β 1 (Kasabova *et al.*, 2014). La même étude a montré que l'augmentation de la sécrétion de cystatine C par les fibroblastes contribue à l'inactivation des cathepsines extracellulaires et favorise l'accumulation du collagène au niveau pulmonaire. D'autre part, l'administration de curcumine, un puissant anti-oxydant et anti-inflammatoire, chez la souris et sur un modèle de fibroblastes humains augmente l'expression des cathepsines K et L et réduit l'expression du TGF- β 1, ce qui contribue à réduire le dépôt de collagène extracellulaire (Dongwei Zhang *et al.*, 2011).

1.4.5. Cibles moléculaires des cathepsines dans les pathologies pulmonaires

Les cibles biologiques des cathepsines à cystéine les plus caractérisées sont les protéines de la matrice extracellulaire et de la membrane basale. Les cathepsines B, K, L et S dégradent l'élastine et le collagène IV, la cathepsine V est une très bonne élastase, la cathepsine K possède une activité collagénolytique vis-à-vis des collagènes I et -II et la cathepsine S possède de nombreuses cibles parmi les constituants de la membrane basale comme la fibronectine, le perlécan, la laminine-211/221 et les nidogènes-1 et -2 (voir 1.3.1.3).

Outre les constituants de la matrice extracellulaire, les cathepsines à cystéine dégradent certaines protéines de jonctions serrées. Les jonctions serrées sont localisées au niveau du pôle apical des cellules épithéliales et sont constituées de trois types de protéines : les claudines, l'occludine, et les *zonula occludens* (ZO) (pour revue : Zahraoui, 2004) (**Figure 18**). Les claudines et l'occludine sont des protéines transmembranaires dont les domaines extracellulaires sont impliqués dans le contact entre les cellules, les ZO quant à elles sont intracellulaires et permettent l'interaction entre le complexe claudine-occludine et le cytosquelette. Le rôle physiologique des jonctions serrées est de former une barrière étanche de façon à empêcher l'infiltration de micro-organismes pathogènes à travers l'épithélium, de réguler le passage d'ions et de molécules à travers l'espace paracellulaire (résistance transépithéliale) et de maintenir la polarité des cellules épithéliales (Zahraoui *et al.*, 2000; Hirota & Knight, 2012). Les cathepsines B, K, L et S sont capables de cliver ZO-1 et ZO-3 aux côtés des caspases durant l'apoptose (Ivanova *et al.*, 2011). La cathepsine L participe à la régulation protéolytique de la claudine-1 dans les cellules intestinales et les cathepsines B, S et L favorise la migration des cellules cancéreuses pancréatiques chez la souris en clivant la cadhérine E (Gocheva *et al.*, 2006; Boudreau *et al.*, 2007). La rupture de la résistance transépithéliale associée à la dégradation des protéines de jonctions serrées est un phénomène qui a été décrit dans des pathologies inflammatoires pulmonaires telles que l'asthme, la fibrose et la BPCO (Soini, 2011; Shaykhiev *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2011; Ohta *et al.*, 2012). Il a été montré que la fumée de cigarette réduit l'expression de ZO-1 et compromet la résistance trans-épithéliale sur un modèle de cellules primaires bronchiques (Schamberger *et al.*, 2014; Schamberger *et al.*, 2015). Bien qu'aucune étude n'ait porté sur l'implication des cathepsines dans la dégradation des protéines de jonctions serrées pulmonaires, leur importance dans l'homéostasie pulmonaire en fait des cibles intéressantes à étudier.

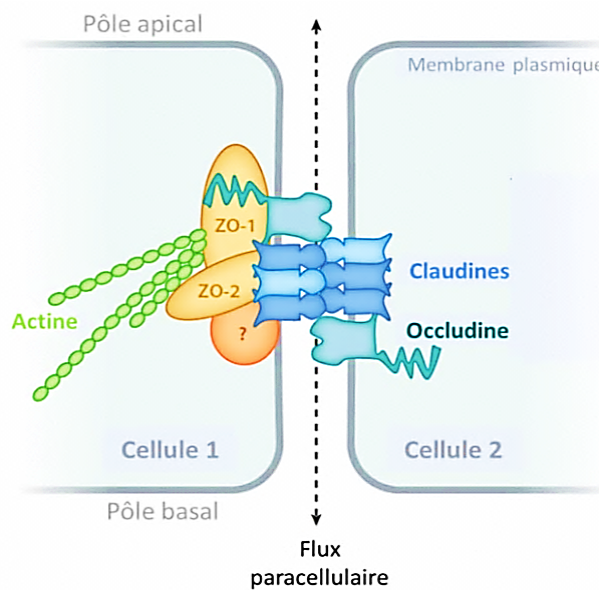


Figure 18 : Représentation schématique d'une jonction serrée
(illustration extraite de Koval, 2013)

D'autres cibles biologiques potentielles des cathepsines sont les peptides et protéines antimicrobiens (PAMs) (pour revue : Lecaille *et al.*, 2015, **Annexe 1**). L'équipe de McElvaney (RCSI, Royal College of Surgeons in Ireland, Dublin, Irlande) a largement contribué à la compréhension du rôle des cathepsines dans l'inactivation des PAMs tels que les β -défensines -2 et -3, le SLPI ou la lactoferrine lors de pathologie pulmonaires inflammatoires comme la mucoviscidose ou l'emphysème (Taggart *et al.*, 2001; Taggart *et al.*, 2003; Rogan *et al.*, 2004). De plus, une étude récente effectuée au laboratoire a montré que la cathepsine S dégrade la protéine du surfactant SP-A et inactive ses propriétés d'agglutination bactérienne (Lecaille *et al.*, 2013, **Annexe 2**). La dégradation des PAMs est traitée dans le chapitre suivant.

2. Les peptides et protéines antimicrobiens humains

2.1. Généralités

Les peptides et protéines antimicrobiens (PAMs) sont des effecteurs importants de la réponse immunitaire innée (Zasloff, 2002). Ils sont présents chez tous les organismes pluricellulaires (Ganz & Lehrer, 1998; Lehrer & Ganz, 1999; Hoffmann *et al.*, 1999). Les PAMs comprennent des peptides cationiques pour la plupart (charge nette de +2 à +9) de 12 à 50 résidus comme les défensines, les cathélicidines et les histatines par exemple, et dont le poids moléculaire est compris entre 2 et 6 kDa. Il existe également, notamment chez les mammifères, des protéines possédant des propriétés antimicrobiennes comme le lysozyme, la lactoferrine ou le SLPI (*secretory leucocyte peptidase inhibitor*), de poids moléculaire très variable (12 à 80 kDa) (pour revue : Wiesner & Vilcinskas, 2010). De manière générale, les PAMs sont actifs contre les bactéries, les virus, les cellules fongiques et les parasites unicellulaires (protozoaires) (Hancock, 2001; Bulet *et al.*, 2004). Les PAMs sont exprimés par les cellules de l'immunité et les cellules épithéliales, soit de façon constitutive ou induite en réponse à une infection par des pathogènes ou à des stimuli pro-inflammatoires. Les peptides antimicrobiens sont synthétisés à partir d'un précurseur constitué d'une pro-région située en position N-terminale et du peptide actif du côté C-terminal, qui est libéré après clivage protéolytique de la proforme (Bals, 2000). Les peptides antimicrobiens sont répertoriés dans des bases de données comme par exemple l'« *Antimicrobial peptide database* » (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) qui regroupe à l'heure actuelle plus de 300 peptides antimicrobiens issus de végétaux et plus de 1800 au sein du règne animal (Wang *et al.*, 2009). Outre leur rôle dans la défense de l'hôte contre les pathogènes, les PAMs sont également capables de moduler la réponse immunitaire par stimulation des cellules de l'immunité comme les monocytes, les neutrophiles ou encore les lymphocytes (Hancock & Sahl, 2006) (**Figure 19**).

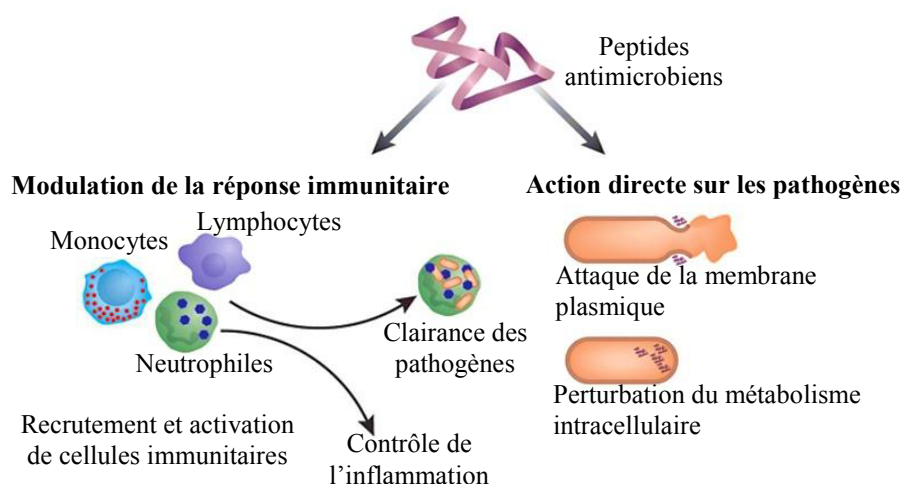


Figure 19 : Rôle des peptides antimicrobiens dans la réponse immunitaire innée
(illustration adaptée de Hancock & Sahl, 2006)

2.2. Structure et classification des peptides antimicrobiens

Les peptides antimicrobiens présentent une grande diversité structurale et peuvent être classés en quatre groupes distincts : les peptides structurés en hélice- α , les peptides structurés en feuillets- β stabilisés par des ponts disulfures, les peptides non structurés contenant un pourcentage élevé d'un type d'acide aminé et les peptides issus de protéines (Boman, 1995; Bulet *et al.*, 2004; Brogden, 2005; Hancock & Sahl, 2006).

2.2.1. Les peptides structurés en hélice- α

Les peptides en hélice- α ont la particularité de contenir dans leur séquence 40 à 60 % de résidus hydrophobes (pour revue : Tossi *et al.*, 2000). Il s'agit de peptides de petite taille (moins de 40 résidus) qui ne contiennent pas de résidu cystéine et qui sont peu structurés en solution aqueuse. Ils adoptent une conformation optimale en hélice- α au contact de la membrane d'un pathogène ou dans un environnement qui mime la membrane plasmique telle que les liposomes (Powers & Hancock, 2003; Brogden, 2005; Jenssen *et al.*, 2006). La structure en hélice- α de ce type de peptides présente des propriétés amphiphiles, c'est-à-dire une surface chargée positivement et une autre surface opposée qui est hydrophobe (**Figure 20**). Chez l'Homme, le peptide structuré en hélice- α le plus caractérisé est la cathélicidine LL-37 (Sørensen *et al.*, 2003).

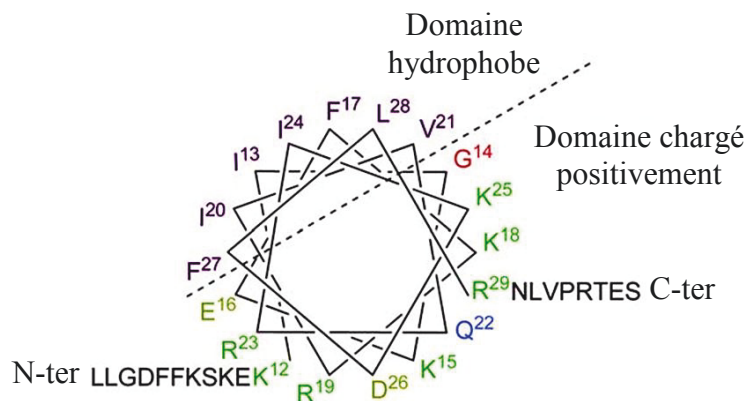


Figure 20 : Représentation en roue hélicoïdale de la cathélicidine LL-37

Le diagramme en roue hélicoïdale représente les résidus 12 à 29 du LL-37 (d'après Burton & Steel, 2009).

2.2.2. Les peptides en feuillets- β stabilisés par des ponts disulfures

Cette classe de peptides regroupe des peptides riches en résidu cystéine, comportant une majorité de feuillets- β dans leur structure secondaire (Brogden, 2005). Leur structure tridimensionnelle est influencée par le nombre de ponts disulfures (1 à 4) qui stabilisent la chaîne polypeptidique. Les peptides contenant un ou deux ponts disulfures adoptent une structure dite en « épingle à cheveux » comme par exemple la cathélicidine porcine protégrine-1 ou la thanatine d'insecte (Bulet *et al.*, 2004). Les peptides qui comportent trois ou quatre ponts disulfures présentent quant à eux une structure dite « cyclique » observée notamment chez la majorité des défensines animales et végétales. Chez l'Homme, les peptides structurés en feuillets- β et qui possèdent trois ponts disulfures correspondent aux α - et les β -défensines (**Figure 21**) (Selsted & Ouellette, 2005; De Smet & Contreras, 2005). Les β -défensines possèdent également une hélice- α permettant leur oligomérisation qui est un processus indispensable à leur activité antimicrobienne (Hoover *et al.*, 2000).

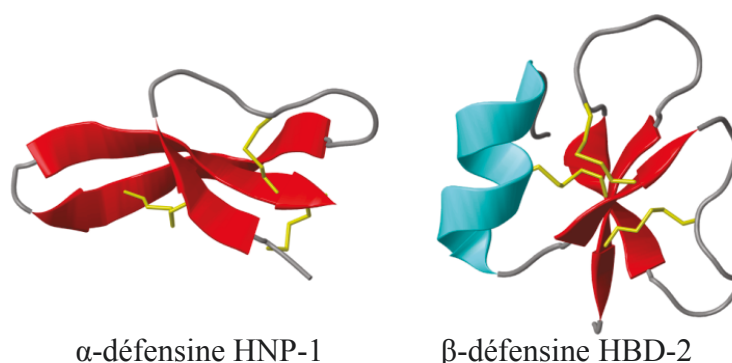


Figure 21 : Structure tridimensionnelle de l'α-défensine humaine HNP-1 et de la β-défensine humaine HBD-2.

Représentation en ruban de l'α-défensine HNP-1 (*human neutrophil peptide-1*, pdb 3gny) et de la β-défensine HBD-2 (*human beta defensin-2*, pdb 1fd3).

2.2.3. Les peptides riches en certains acides aminés

Ces peptides ne présentent pas ou peu de structures secondaires et sont caractérisés par une séquence riche en un ou deux acides aminés particuliers (Hancock, 2001). Les histatines sont des peptides riches en histidine et sont les seuls de cette catégorie exprimés chez l'être humain (De Smet & Contreras, 2005). Il existe chez d'autres mammifères des peptides riches en tryptophane comme l'indolicidine bovine, ou bien enrichis en deux acides aminés tels que la cathélicidine porcine PR-39 et les bacténécines bovines Bac 5 et Bac 7 qui sont riches en proline et en arginine, et la prophénine porcine qui est riche en proline et en phénylalanine (Selsted *et al.*, 1992; Boman, 1995; Zhao *et al.*, 1995; De Smet and Contreras, 2005).

2.2.4. Les peptides issus de protéines et les protéines antimicrobiennes

Certains peptides antimicrobiens peuvent être générés par clivage protéolytique d'une protéine native dépourvue de propriétés antimicrobiennes (Brogden, 2005). L'hémoglobine peut subir une hydrolyse intra-érythrocytaire et générer des peptides antimicrobiens appelés hémocidines qui proviennent principalement du domaine N-terminal de la chaîne d' α -globine et du domaine C-terminal de la chaîne de β -globine (Mak *et al.*, 2004). Il existe également des protéines antimicrobiennes, c'est le cas par exemple de la lactoferrine qui, grâce à ses propriétés de chélation du fer, possède une activité anti-biofilm contre la bactérie *P. aeruginosa* (pour revue : Jenssen & Hancock, 2009). D'autres protéines comme le lysozyme et la BPI (*Bactericidal/permeability increasing protein*) agissent sur les bactéries en déstabilisant la paroi bactérienne, exposant ainsi la membrane plasmique de la bactérie au milieu extracellulaire et la rendant plus vulnérable aux peptides antimicrobiens et aux variations de la pression osmotique (Yoshimura *et al.*, 1988; Elsbach, 1998). Chez l'Homme, de nombreuses protéines possèdent des propriétés antimicrobiennes ou peuvent générer des peptides antimicrobiens suite à une protéolyse spécifique (pour revue : Wiesner & Vilcinskis, 2010). Cela concerne par exemple des chimiokines comme GCP-2 (*granulocyte chemotactic protein-2*) et MIP-3 α (*macrophage inflammatory protein-3 α*), des protéases de neutrophile (CatG, HNE), des inhibiteurs de protéases (SLPI, élafine), des nucléases (RNases-5 et -7), des hormones (adrénomédulline) et des peptides dérivés de protéines de ménage (buforines-I et -II dérivées de l'histone 2A).

2.2.5. Expression et bio-distribution

Les PAMs sont exprimés de façon ubiquitaire, soit de façon constitutive, soit en réponse à l'invasion d'un micro-organisme (Lehrer & Ganz, 1999; Zasloff, 2002; Ganz, 2002). Chez l'Homme, ils sont préférentiellement exprimés par les cellules épithéliales au niveau de la peau et des muqueuses (voies respiratoires, appareil digestif, appareil uro-génital) qui constituent la première voie d'entrée des pathogènes (**Tableau 8**). Les PAMs sont également largement exprimés par les cellules de l'immunité telles que les polynucléaires neutrophiles, les macrophages ou encore les cellules dendritiques. Au niveau cellulaire, les PAMs sont stockés dans des compartiments subcellulaires souvent appelés granules, c'est le cas notamment des neutrophiles et des cellules intestinales de Paneth (Ganz, 2003). Outre leur localisation à la surface des épithélia, les PAMs peuvent être également présents dans les sécrétions corporelles comme la sueur, le lait ou encore les fluides séminaux.

Tableau 8 : Classification et bio-distribution des principaux PAMs humains

HNP: *human neutrophil peptides*, HD: *human defensins*, HBD: *human beta defensins*, BPI: *bactericidal/permeability increasing protein*, SLPI: *secretory leucocyte peptidase inhibitor*

Nom		Bio-distribution	Références	
Peptides antimicrobiens				
Hélice- α Feuillets- β stabilisés par ponts S-S	α -Défensines	LL-37 Peau, sueur, épithélium pulmonaire, muqueuse intestinale, tractus urogénital, neutrophiles, cellules NK, lymphocytes	(Agerberth <i>et al.</i> , 1995; Cowland <i>et al.</i> , 1995; Bals, Wang, Zasloff, <i>et al.</i> , 1998; Vandamme <i>et al.</i> , 2012)	
		HNP-1 HNP-3	Neutrophiles, muqueuse intestinale, épithélium pulmonaire, épithélium oropharyngé	(Selsted <i>et al.</i> , 1985; Daher <i>et al.</i> , 1986)
		HD-5	Muqueuse intestinale, muqueuse vaginale, épithélium pulmonaire, neutrophiles	(Jones & Bevins, 1992; Frye <i>et al.</i> , 2000; Lehrer and Ganz, 2002)
	β -Défensines	HBD-1	Muqueuse intestinale, épithélium rénal, épithélium pulmonaire, thymus, épithélium mammaire, muqueuse vaginale	(Bensch <i>et al.</i> , 1995; Dunsche <i>et al.</i> , 2001; Schneider <i>et al.</i> , 2005)
		HBD-2	Épithélium rénal, peau, épithélium pulmonaire, muqueuse intestinale et stomacale, foie, pancréas	(Harder, Bartels, <i>et al.</i> , 1997; Harder, Siebert, <i>et al.</i> , 1997; Dunsche <i>et al.</i> , 2001)
		HBD-3	Épithélium rénal, peau, épithélium pulmonaire, thymus, épithélium oropharyngé, muscle squelettique	(Harder <i>et al.</i> , 2001; Dunsche <i>et al.</i> , 2001)
	Non structurés riches en His	Histatine-1	Salive, glandes parotides	(Oppenheim <i>et al.</i> , 1988; Tsai and Bobek, 1998)
Histatine-3				
Protéines antimicrobiennes				
	SLPI	Salive, épithélium pulmonaire, muqueuse intestinale, tractus urogénital, peau, neutrophiles, macrophages	(Hiemstra <i>et al.</i> , 1996; McNeely <i>et al.</i> , 1997; Wiedow <i>et al.</i> , 1998)	
	Lactoferrine	Épithélium mammaire, lait, fluides séminaux, sang, épithélium pulmonaire, muqueuse intestinale, tractus urogénital, neutrophiles, macrophages	(Ellison <i>et al.</i> , 1988; Levay & Viljoen, 1995; Berkhout <i>et al.</i> , 2002)	
	Lysozyme	Fluides lacrymaux, lait, salive, muqueuse intestinale et stomacale, épithélium pulmonaire, épithélium rénal	(Hankiewicz and Swierczek, 1974; Mason & Taylor, 1975; Klockars & Reitamo, 1975)	
	BPI	Neutrophiles, éosinophiles, muqueuse intestinale, épithélium pulmonaire et oropharyngé	(Elsbach, 1998; Canny <i>et al.</i> , 2002; Schultz & Weiss, 2007)	

2.2.6. Mécanismes d'action

Les PAMs présentent un large spectre d'activité et peuvent agir contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, contre les cellules fongiques, les parasites, et certains virus (Zasloff, 2002). Contrairement aux cellules fongiques et les parasites, les mécanismes d'action des peptides antimicrobiens sont bien décrits sur les bactéries et les virus. La plupart des peptides antimicrobiens perméabilisent la membrane plasmique de la cellule cible et peuvent également inhiber le métabolisme intracellulaire, comme la traduction des ARN messagers en protéines, en se fixant sur l'ADN bactérien chargé négativement (Yeaman & Yount, 2003; Brogden, 2005).

2.2.6.1. Interaction avec la paroi et la membrane plasmique

Les PAMs interagissent de façon sélective avec la membrane/paroi des cellules cibles. Dans un premier temps, ils interagissent avec certains constituants de la paroi, chargés négativement comme le lipopolysaccharide (LPS) des bactéries à Gram négatif, les acides teichoïques et lipoteichoïques des bactéries à Gram positif (**Figure 22**) et les phosphomannoprotéines des cellules fongiques (Salzman *et al.*, 2004; Nizet, 2006). Les PAMs vont ensuite diffuser à travers la paroi bactérienne jusqu'à atteindre l'espace périplasmique avant d'interagir avec la membrane plasmique (Sochacki *et al.*, 2011).

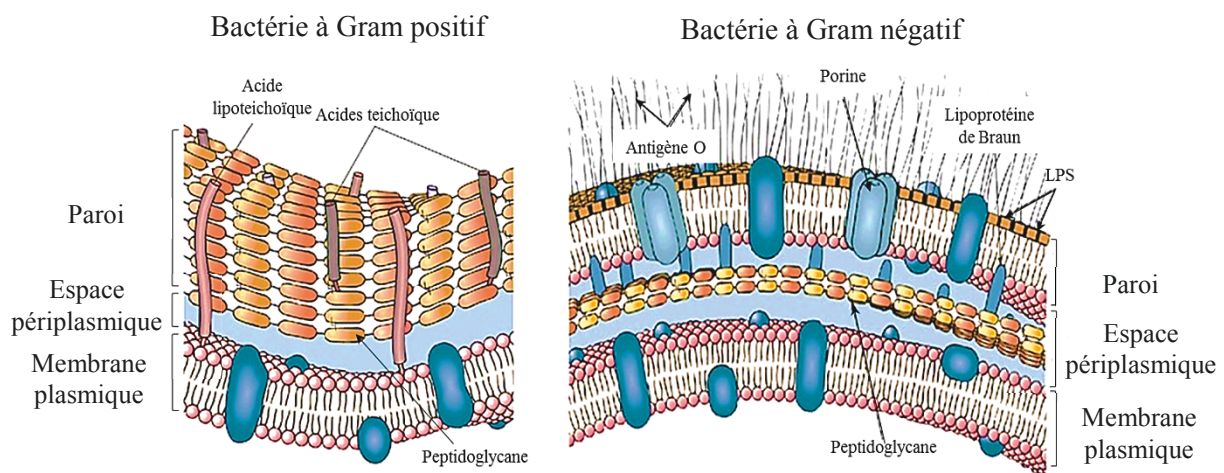


Figure 22 : Schéma de la structure de la paroi des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. (illustration extraite de Prescott *et al.*, 2003)

Contrairement aux membranes plasmiques d'eucaryotes qui sont riches en cholestérol et en phospholipides non chargés comme la phosphatidylcholine et la phosphatidyléthanolamine, les membranes plasmiques de procaryotes contiennent majoritairement des phospholipides hydroxylés chargés négativement comme le phosphatidylglycérol ou la phosphatidylsérine

(Matsuzaki, 1999; Yeaman & Yount, 2003). L'interaction entre les PAMs et la membrane plasmique des pathogènes va donc s'effectuer principalement via des interactions électrostatiques (**Figure 23**) (Jenssen *et al.*, 2006). Après interaction, les PAMs vont s'intégrer dans la bicouche lipidique, et ainsi agir sur la membrane plasmique (Yeaman & Yount, 2003).

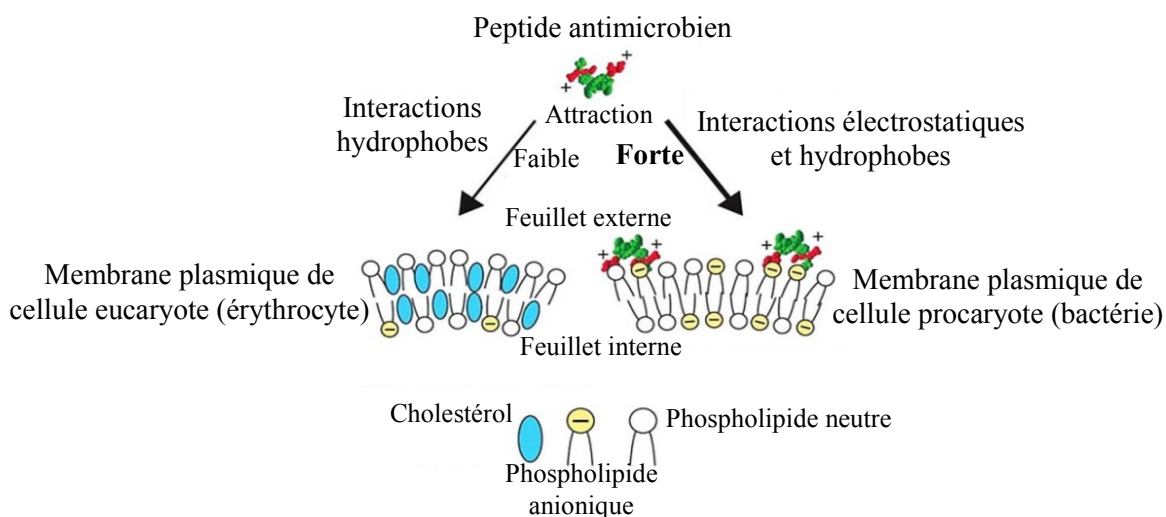


Figure 23 : Interaction des peptides antimicrobiens cationiques avec la membrane plasmique de cellules eucaryotes et procaryotes.
(d'après Zasloff, 2002)

2.2.6.2. Perturbation de la membrane plasmique

Les PAMs perméabilisent la membrane soit par formation de « pores » ou « canaux », soit par rupture de la membrane suite à une incorporation excessive de peptide dans la bicouche lipidique (Tossi *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2000). Trois modèles décrivant leur mode d'action ont été proposés : le modèle en douve de tonneau (*barrel-stave*), le modèle des pores toroïdaux (*toroidal pores, wormhole*) et le modèle en tapis (*carpet-like*) (Brogden, 2005). Dans le modèle en douve de tonneau (Ehrenstein & Lecar, 1977; Breukink & de Kruijff, 1999), les peptides s'associent entre eux à la surface de la membrane pour former des oligomères puis s'insèrent dans la bicouche lipidique parallèlement aux phospholipides pour former un pore aqueux (**Figure 24 A**) (Bechinger, 1999; L. Yang *et al.*, 2001). Les peptides sont disposés dans la membrane comme les lattes d'un tonneau, avec les domaines hydrophobes qui interagissent avec les phospholipides, tandis que les domaines hydrophiles composent la lumière du pore. Ce mécanisme a été décrit pour l'alaméthicine du champignon *Trichoderma viride*, un peptide structuré en hélice- α qui génère des pores transmembranaires dont la structure est comparable à celle de canaux sodiques voltage dépendant (Sansom, 1991; Béven *et al.*, 1999). Dans le second modèle du pore toroïdal, les peptides restent associés avec

les têtes polaires des phospholipides même après leur insertion dans la membrane, provoquant une courbure des feuillet membranaires (**Figure 24 B**) (Matsuzaki *et al.*, 1996). Ainsi la lumière du pore toroïdal est à la fois bordée par les domaines hydrophiles des peptides et par les têtes polaires des phospholipides. Les peptides en hélice- α comme la cathélicidine humaine LL-37, la magainine-2 d'amphibien et la mélittine de l'abeille, et les peptides en feuillet- β comme la protégrine-1 porcine et les α -défensines humaines HNP-1 et -2 agiraient selon ce mode d'action (Kagan *et al.*, 1990; Wimley *et al.*, 1994; Yang *et al.*, 1998; L. Yang *et al.*, 2001; Yamaguchi *et al.*, 2002). Dans le cas du modèle en tapis, les peptides vont d'abord tapisser toute la surface externe de la membrane plasmique du pathogène, déstabilisant la membrane via la formation de micelles constitués de peptides et de phospholipides membranaires, selon un mode d'action proche de celui d'un détergent (**Figure 24 C**) (Shai, 1999; Bechinger, 1999; Yamaguchi *et al.*, 2001; Ladokhin and White, 2001). Ce mécanisme a été décrit pour la cécropine P1 porcine et la mélittine d'abeille ; deux peptides en hélice- α , et sur un peptide non structuré, riche en résidu tryptophane ; l'indolicidine bovine (Gazit *et al.*, 1995; Naito *et al.*, 2000; Rozek *et al.*, 2000). L'ensemble de ces mécanismes sont bien caractérisés sur les peptides antimicrobiens de faible poids moléculaire (entre 3 et 5 kDa), cependant ils n'ont pas été décrits précisément sur les protéines antimicrobiennes comme le SLPI, le lysozyme ou encore la lactoferrine.

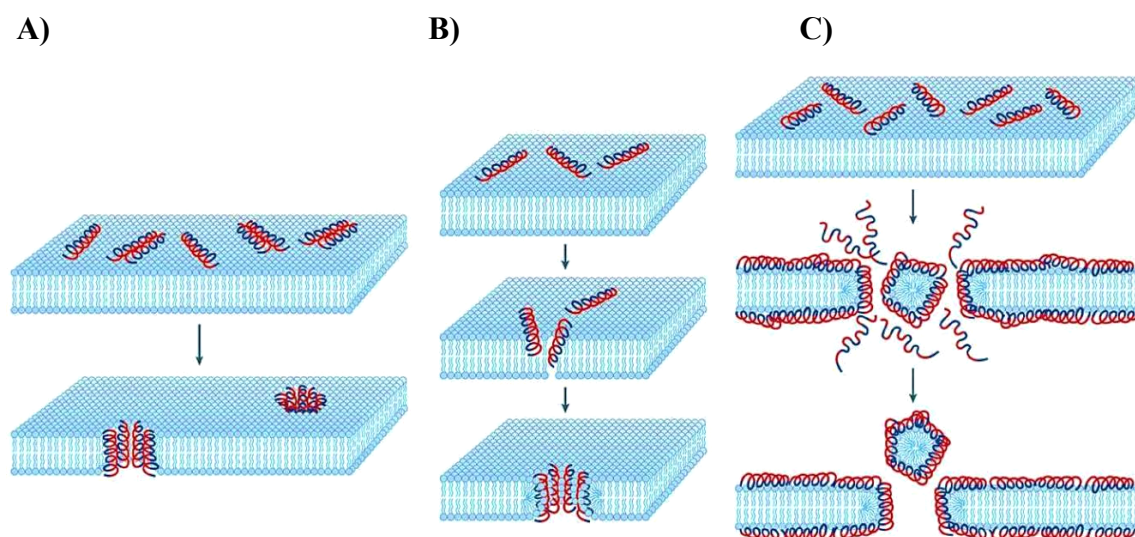


Figure 24 : Mécanismes d'action des peptides antimicrobiens sur la membrane plasmique des pathogènes.

A) le modèle en douve de tonneau, B) le modèle des pores toroïdaux, C) le modèle en tapis. Les domaines hydrophiles des peptides antimicrobiens sont en rouge et les domaines hydrophobes sont en bleu. (schéma extrait de Brogden, 2005).

2.2.6.3. Perturbation des voies de biosynthèse intracellulaire

Après perméabilisation de la membrane plasmique, certains peptides antimicrobiens subissent une translocation vers le compartiment intracellulaire et vont agir comme des inhibiteurs métaboliques (Brogden, 2005). Il a été montré que les peptides antimicrobiens structurés en hélice- α comme la buforine II d'amphibien et la pleurocidine de poisson sont capables d'interagir avec l'ADN et l'ARN d'*E. coli* et inhiber ainsi la synthèse des acides nucléiques et des protéines de la bactérie (Park *et al.*, 1998; Patrzykat *et al.*, 2002). Les mêmes observations ont été faites avec des peptides structurés en feuillets- β comme l' α -défensine humaine HNP-1, ainsi que des peptides non structurés comme la cathélicidine porcine PR-39 (riche en proline et arginine) et l'indolicidine bovine (riche en tryptophane) (Lehrer *et al.*, 1989; Boman *et al.*, 1993; Subbalakshmi & Sitaram, 1998). Outre leur action sur la synthèse des protéines, certains peptides antimicrobiens riches en proline comme la pyrrhocoricine, la drosocine, et l'apidaecine issus d'insectes, interagissent avec des protéines chaperonnes impliquées dans le repliement correct des protéines néo-synthétisées (Otvos *et al.*, 2000; Kragol *et al.*, 2001). Ainsi la cellule bactérienne meurt suite à l'accumulation au niveau cytoplasmique de protéines mal repliées et non fonctionnelles.

2.3. Les PAMs et essais thérapeutiques

Face à la recrudescence des micro-organismes multirésistants aux antibiotiques couramment utilisés en milieu hospitalier, l'utilisation des PAMs ou de dérivés synthétiques de PAMs représente une alternative thérapeutique intéressante (pour revue : Afacan *et al.*, 2012). De nombreux dérivés de PAMs humains comme les défensines (PMX-30063), la BPI (XOMA-629), des histatines 3 et 5 (PAC-113), de la lactoferrine (hLF1-11) et le LL-37 (OP-45), sont actuellement en cours d'essais cliniques dans le cadre de thérapies anti-infectieuses (**Tableau 9**). Pour l'instant, la mise au point d'antibiothérapies à base de dérivés de PAMs humains se focalise principalement sur les septicémies et les infections cutanées.

Tableau 9 : Dérivés de PAMs humains en cours d'essais cliniques

SARM : *S. aureus* résistant à la méthicilline, BPI : *bactericidal/permeability increasing protein* (d'après Afacan *et al.*, 2012; Hancock *et al.*, 2012).

Nom	Description	Application	Activité	Essais cliniques	Compagnie pharmaceutique
PMX-30063	Analogue structural des défensines humaines	Antibiotique administré par voie systémique	SARM	Phase II	Polymedix
XOMA-629	Dérivé de la BPI	Traitement des impétigos (infections cutanées)	SARM	Phase IIa	Xoma
rBPI21	Dérivé de la BPI	Antibiotique administré par voie systémique	<i>A.baumannii</i>	Phase II	Xoma
PAC-113	Dérivé des histatines 3 et 5 humaines	Antifongique pour soigner les candidoses buccales	<i>C. albicans</i>	Phase IIb	Pargen-biopharmaceuticals
hLF1-11	Dérivé de la Lactoferrine humaine	Traitement préventif des septicémies et des infections fongiques chez les immunodéprimés	SARM <i>A. baumannii</i> <i>C. albicans</i>	Phase II	AM-pharma
OP-145	Dérivé du LL-37	Traitement des otites	Non renseignée	Phase II	Octoplus

2.4. Les PAMs pulmonaires chez l'Homme

Le tissu pulmonaire est constamment exposé aux microorganismes potentiellement pathogènes présents dans l'air inspiré. Les cellules épithéliales bronchiques et alvéolaires ainsi que les cellules de l'immunité présentes au niveau du poumon (neutrophiles, macrophages), expriment tout un arsenal de peptides et de protéines à activité antimicrobienne (pour revue : Rogan *et al.*, 2006) tels que les α - et β -défensines, la cathélicidine LL-37, les protéines du surfactant SP-A et SP-D, le lysozyme, la lactoferrine, le SLPI et l'élafine, deux inhibiteurs de protéases à sérine. Ils constituent une barrière contre la colonisation par les bactéries, les virus ou encore les cellules fongiques. Les PAMs participent également à la modulation de la réponse immunitaire en régulant le recrutement des cellules de l'immunité et la production de cytokines pro-inflammatoires.

2.4.1. Le lysozyme et la lactoferrine

Le lysozyme et la lactoferrine sont deux protéines antimicrobiennes les plus exprimées au niveau du tissu pulmonaire avec des concentrations comprises entre 1 et 70 μ M environ. Le lysozyme et la lactoferrine sont exprimés de façon constitutive par les neutrophiles, les

monocytes et les macrophages ainsi que par les cellules épithéliales pulmonaires (Brogan *et al.*, 1975; Harbitz *et al.*, 1984; Ganz, 2004; Dubin *et al.*, 2004) (**Tableau 9**).

2.4.1.1. Le lysozyme

Le lysozyme a été identifié pour la première fois par Fleming en 1922 (Fleming, 1922). Il s'agit d'une enzyme appartenant à la famille des glycosidases (EC 3.2.1.17) qui catalyse le clivage des liaisons O-glycosidiques liant l'acide N-acétyl-muramique et la N-acétyl-glucosamine, constituants majoritaires du peptidoglycane de la paroi bactérienne (Laible & Germaine, 1985). Le lysozyme est une protéine de 14,3 kDa (charge nette : +8, pI : 10,5) de 130 résidus dont la structure tridimensionnelle est stabilisée par 4 ponts disulfures et se divise en deux domaines séparés par le site actif de l'enzyme (Johnson & Phillips, 1965; Proctor & Cunningham, 1988) (**Figure 25**). Le caractère cationique du lysozyme lui permet d'exercer une activité antimicrobienne indépendante de son activité enzymatique (Laible & Germaine, 1985). Le lysozyme possède une activité bactéricide contre des bactéries à Gram positif comme *B. megaterium*, *M. luteus*, ou *S. faecalis*, et à Gram négatif (uniquement en synergie avec la lactoferrine) comme *E. coli*, *V. cholerae*, et *S. typhimurium* (Laible & Germaine, 1985; Ellison & Giehl, 1991). La surexpression pulmonaire du lysozyme dans des modèles de souris transgéniques améliore de façon significative la survie de l'animal après infection par *P. aeruginosa* comparée aux souris sauvages (Akinbi *et al.*, 2000). L'instillation intra-trachéale de lysozyme humain recombinant sur un modèle de hamster Syrien, en combinaison ou non avec de la tobramycine, protège l'animal contre l'infection pulmonaire par *P. aeruginosa* (Bhavsar *et al.*, 2010; Bhavsar *et al.*, 2011). Il a été montré sur un modèle de cellules primaire bronchiques humaines mises en culture sur une trachée de rat isolée que la déplétion en lysozyme à l'aide d'un anticorps dirigé spécifiquement contre le lysozyme améliore la survie de la bactérie *E. coli* après son inoculation sur la trachée (Dajani *et al.*, 2005).

2.4.1.2. La lactoferrine

La lactoferrine est une glycoprotéine d'environ 80 kDa (charge nette : +11, pI : 8,5) constituée de deux domaines homologues d'environ 330 résidus (un domaine N-terminal et un domaine C-terminal) comportant chacun un site de liaison au fer, sous la forme d'ion ferrique (Fe^{3+}) (Baker & Baker, 2005) (**Figure 25**). Les propriétés de chélation du fer de la lactoferrine lui confèrent à la fois une activité bactériostatique et anti-biofilm vis-à-vis de bactéries à Gram négatif comme *P. aeruginosa* et *B. cenocepacia* et à Gram positif comme *S.*

epidermidis, pour lesquelles le fer est un élément nutritif essentiel (Leitch & Willcox, 1999; Berlutti *et al.*, 2005). D'autre part, la lactoferrine possède une activité bactéricide indépendante de sa capacité de liaison du fer, notamment grâce à son affinité pour certains composants majeurs de la paroi bactérienne comme le LPS et l'acide lipoteichoïque (van Berkel *et al.*, 1997; Leitch & Willcox, 1999). Les propriétés bactéricides sont liées à une séquence de 17 résidus, riche en arginine et située du côté N-terminal de lactoferrine. La lactoferrine est également capable de protéger les cellules contre certains virus comme le VIH, le virus de l'hépatite C, le poliovirus et le virus influenza en bloquant leur interaction avec des récepteurs cellulaires et en inhibant ainsi l'entrée de la particule virale dans la cellule cible (Yi *et al.*, 1997; Marchetti *et al.*, 1999; Berkhout *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2005).

2.4.2. Les inhibiteurs de protéases à activité antimicrobienne

Le SLPI, la trappine-2 et l'élaïne constituent les principaux inhibiteurs de protéases à sérine retrouvés dans les sécrétions bronchiques (pour revue : Moreau *et al.*, 2008). Au niveau pulmonaire, le SLPI, la trappine-2 et l'élaïne régulent l'activité des protéases à sérine de neutrophile comme l'élastase (HNE), la cathepsine G (Cat G) et la protéinase 3 (Pr-3) (K_i de l'ordre du nanomolaire). En plus de leur fonction de régulation des protéases de neutrophile, ces antiprotéases jouent un rôle dans la défense antimicrobienne du tissu pulmonaire (Hiemstra *et al.*, 1996; Simpson *et al.*, 1999).

2.4.2.1. Le SLPI

Le SLPI (11,7 kDa) est une protéine cationique (charge nette : +12, pI : 9,5) exprimée par les neutrophiles, les macrophages et les cellules épithéliales pulmonaires (Doumas *et al.*, 2005) (**Tableau 9**). Il est constitué d'un domaine WAP-1 (*whey acidic protein*) du côté N-terminal et d'un domaine WAP-2 du côté C-terminal (Thompson & Ohlsson, 1986). Chaque domaine comporte une cinquantaine de résidus et leur structure tridimensionnelle est stabilisée par quatre ponts disulfures (**Figure 25**). Au niveau des voies respiratoires supérieures, la concentration du SLPI est d'environ 8,7 μ M tandis que sa concentration dans les voies respiratoires inférieures est d'environ 0,6 μ M (Vogelmeier *et al.*, 1991). L'expression pulmonaire du SLPI est modulée par divers stimuli tels que le LPS, l'HNE et les cytokines pro-inflammatoires (Scott *et al.*, 2011). Le SLPI possède une activité antibactérienne vis-à-vis de *S. aureus*, *P. aeruginosa* et *E. coli* et une activité antifongique vis-à-vis *C. albicans* et *A. fumigatus* (Hiemstra *et al.*, 1996; Tomee *et al.*, 1997; Wiedow *et al.*, 1998). Il a été montré

que l'activité antibactérienne du SLPI est majoritairement portée par le domaine N-terminal WAP-1 (charge nette : +7) qui est plus cationique que le domaine C-terminal WAP-2 (charge nette : +5) (Hiemstra *et al.*, 1996). Cependant, l'activité antibactérienne du SLPI entier vis-à-vis de *S. aureus* et *E. coli* est plus importante que celle des deux domaines isolés. Le SLPI protège également les cellules de l'immunité contre le virus de l'immunodéficience humaine-I (VIH-I) (Wahl *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 2004). Le SLPI est capable de bloquer la synthèse d'ADN virale et d'interagir avec l'annexine-II membranaire des monocytes et des macrophages, inhibant ainsi l'entrée du virus dans ces cellules (Ma *et al.*, 2004).

2.4.2.2. La trappine-2 et l'élafine

La trappine-2 (*Transglutaminase substrate and WAP domain containing protein*) ou pré-élafine est une protéine (9,9 kDa) cationique (charge nette : +7, pI : 9) exprimée par les neutrophiles, les macrophages et les cellules épithéliales pulmonaires (Williams *et al.*, 2006) (**Tableau 9**). Elle est constituée d'un domaine N-terminal de 38 résidus, appelé domaine cémentoïne contenant des séquences répétées GQDPVK (Nara *et al.*, 1994). Ces séquences permettent à la fois la formation de polymères de trappine-2 et l'ancrage covalent de la molécule aux protéines de la matrice extracellulaire par transglutamination. Le domaine WAP en position C-terminale de la trappine-2 présente 40% d'homologie de séquence avec le domaine C-terminal du SLPI; il est constitué de 57 résidus et contient l'élafine (*elastase specific inhibitor*). L'élafine est générée à partir de la trappine-2 après clivage par la tryptase (Guyot *et al.*, 2005). L'élafine est présente au niveau des sécrétions bronchiques à des concentrations variant entre 1,5 et 4,5 μM (Moreau *et al.*, 2008). Au même titre que le SLPI, l'expression pulmonaire de la trappine-2 est modulée par le LPS, l'HNE et les cytokines pro-inflammatoires (Baranger *et al.*, 2008). La trappine-2 et l'élafine possèdent une activité bactéricide vis-à-vis de *P. aeruginosa* et *S. aureus* et une activité antifongique vis-à-vis de *C. albicans* et *A. fumigatus* (Simpson *et al.*, 1999; Baranger *et al.*, 2008). L'activité bactéricide de la trappine-2 vis-à-vis de *P. aeruginosa* et *S. aureus* est plus importante comparée à celle de l'élafine et du domaine cémentoïne testés séparément (Simpson *et al.*, 1999). L'utilisation d'un mutant de la trappine-2 dépourvu d'activité inhibitrice vis-à-vis des protéases à sérine de neutrophile (trappine-2 A62D/M63L) a montré que les propriétés antibactériennes de la trappine-2 sont indépendantes de son activité antiprotéasique (Baranger *et al.*, 2008). L'élafine est capable de protéger les lymphocytes T contre le VIH-I, en revanche rien n'a été démontré pour la trappine-2 (Iqbal *et al.*, 2009).

2.4.3. Les défensines

Les défensines se divisent en deux familles : les α -défensines et les β -défensines (Ganz, 2003). La structure tridimensionnelle des α - et des β -défensines est constituée de feuillets- β et stabilisée par 3 ponts disulfures qui leur confèrent une structure compacte et une résistance accrue à la protéolyse (Yount & Yeaman, 2004) (**Figure 25**). Les α -défensines sont des peptides cationiques (charge nette : +2 à +3, pI : 8,3 à 8,7) de 29 à 35 résidus et d'un poids moléculaire d'environ 3,4 kDa (Diamond *et al.*, 2009) (**Tableau 9**). Les α -défensines sont également appelées HNP (pour *human neutrophil peptides*), puisque la première α -défensine a été isolée chez les neutrophiles (Ganz *et al.*, 1985). Il existe 4 HNPs : HNP-1 à HNP-4, exprimées au niveau des granules azurophiles de neutrophiles, les HNP-1, -2 et -3 étant majoritaires et leur concentration dans les sécrétions bronchiques est de l'ordre du micromolaire (Ganz *et al.*, 1990; Harwig *et al.*, 1994). Les HNPs sont également exprimées par d'autres cellules de l'immunité comme les lymphocytes B, les monocytes et les cellules NK (Selsted & Ouellette, 2005). Il existe deux autres α -défensines : HD-5 et HD-6 (pour *human defensins*) exprimées au niveau des cellules Paneth intestinales et au niveau du tractus génital chez la femme, mais elles sont peu exprimées au niveau du poumon (Frye *et al.*, 2000). Les β -défensines (ou HBDs pour *human beta defensins*) sont des peptides composés de 36 à 50 résidus (charge nette : +4 à +11, pI : 8,9 à 10) dont le poids moléculaire varie de 3,9 à 5,2 kDa (Jonard *et al.*, 2006; Diamond *et al.*, 2009). Leur structure tridimensionnelle diffère légèrement de celle des α -défensines de par la position de leurs ponts disulfures. Il existe 11 β -défensines exprimées chez l'Homme, les principales étant les HBD-1, -2, -3 et -4 (pour revue : Chen *et al.*, 2006; Jarczak *et al.*, 2013). Contrairement aux HNPs, les peptides HBD-1 à -4 sont principalement exprimés par les cellules épithéliales pulmonaires et présentent des concentrations dans les sécrétions bronchiques de l'ordre du nanomolaire (Bals *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998). L'expression des β -défensines pulmonaires est régulée par le LPS et par les cytokines pro-inflammatoires comme par exemple l'IFN- γ , l'IL-1 β ou le TNF- α (Selsted & Ouellette, 2005; Herr *et al.*, 2007). De façon générale, les défensines possèdent un large spectre d'activité antimicrobienne contre les bactéries à Gram négatif (*E. coli*, *P. aeruginosa*), à Gram positif (*S. aureus*, *S. pyogenes*), les cellules fongiques (*C. albicans*, *C. neoformans*) et le VIH (Ganz *et al.*, 1985; Quiñones-Mateu *et al.*, 2003; Jonard *et al.*, 2006; Herr *et al.*, 2007).

2.4.4. La cathélicidine LL-37

Les cathélicidines sont une famille de peptides synthétisés sous la forme d'un précurseur constitué d'un domaine N-terminal conservé appelé domaine cathéline (qui est un acronyme de *cathepsin L inhibitor*) et d'un domaine antimicrobien C-terminal dont la séquence, la taille et la structure secondaire varient en fonction de l'hôte (pour revue : Zanetti, 2004). La seule cathélicidine exprimée chez l'Homme est le LL-37, obtenu après clivage par la Pr-3 de son précurseur : le hCAP-18 (*human cathelicidin antimicrobial peptide*, 18 kDa) (Sørensen *et al.*, 2001). Le LL-37 est un peptide cationique de 37 résidus (charge nette : +6, pI : 10,6) structuré en hélice- α et d'un poids moléculaire de 4,5 kDa (**Tableau 9**). L'origine de son nom vient du fait qu'il soit composé de 37 résidus et que les deux premiers soient des leucines. Au niveau du poumon, le LL-37 dont la concentration est comprise entre 1 et 10 nM est exprimé par les cellules immunitaires telles que les neutrophiles, les macrophages, les lymphocytes et les cellules épithéliales (Bals, Wang, Zasloff, *et al.*, 1998; Agerberth *et al.*, 2000). Outre la présence de pathogènes et les stimuli pro-inflammatoire, d'autres effecteurs tels que la vitamine D3 et l'acide butyrique (acide gras à courte chaîne) peuvent moduler l'expression du LL-37 (Koeffler *et al.*, 1985; Lysenko *et al.*, 2000; Kida *et al.*, 2006; Peric *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2009; Gombart, 2009). De la même manière que les défensines, le LL-37 possède une activité antimicrobienne contre de nombreux pathogènes comprenant des bactéries à Gram négatif (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*) et à Gram positif (*S. aureus*, *S. pneumoniae*, streptocoques du groupe A), des cellules fongiques (*C. albicans*) et certains virus (VIH, influenza, herpes simplex-1) (pour revue : Vandamme *et al.*, 2012). De plus, LL-37 possède également des propriétés anti-biofilm contre *P. aeruginosa* et *F. novicida* (Overhage *et al.*, 2008; Amer *et al.*, 2010). Il a été montré sur un modèle murin infecté par *P. aeruginosa* que la surexpression pulmonaire du LL-37 par l'intermédiaire d'un vecteur adénoviral améliore la clairance bactérienne comparée aux animaux non traités (R. Bals *et al.*, 1999). Outre le LL-37, le prodomaine cathéline du précurseur hCAP-18 présente également une activité antimicrobienne vis-à-vis de *S. aureus* et *E. coli* (Zaiou *et al.*, 2003). Outre son activité directe sur les pathogènes, le LL-37 participe également à la formation et à la stabilisation des NETs (*neutrophil extracellular traps*) qui sont des structures essentiellement constituées d'ADN et impliquées dans les défenses antibactériennes (Neumann *et al.*, 2014b; Neumann *et al.*, 2014a).

2.4.5. Les protéines du surfactant A et D (SP-A et SP-D)

Les protéines du surfactant pulmonaire appartiennent à la famille des collectines (pour *collagen-like lectins*). Les protéines SP-A et SP-D sont hydrophiles et sont majoritairement impliquées dans la défense antimicrobienne du tissu pulmonaire, par opposition aux protéines SP-B et SP-C qui sont hydrophobes et qui régulent quant à elles les propriétés tensio-actives du surfactant (Kuroki *et al.*, 2007). Les protéines SP-A et SP-D sont majoritairement produites par les pneumocytes de type II et les cellules de Clara (cellules non ciliées) (Crouch & Wright, 2001) (**Tableau 9**). Leur expression est régulée par les glucocorticoïdes et les cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ ou le TNF- α (Boggaram *et al.*, 1989; Dulkerian *et al.*, 1996; Ikegami *et al.*, 2000; Seppänen *et al.*, 2005; Fujita *et al.*, 2005). Les formes monomériques de ces collectines présentent un poids moléculaire d'environ 34 kDa pour SP-A (pI du CRD : 5, charge nette du CRD: -3) et 43 kDa pour SP-D (pI du CRD: 4,7, charge nette du CRD : -5), et s'associent en trimères pour former des sous-unités. Ces sous-unités sont constituées d'un domaine N-terminal de type collagène structuré en triple hélice et d'un domaine lectine du côté C-terminal appelé CRD (*carbohydrate recognition domain*), les deux domaines étant séparés par une région « coude » (**Figure 25**). La protéine SP-A va s'assembler en octadécamère (~612 kDa) composé de 6 sous-unités trimériques chacune liées entre elles par des ponts disulfures, le tout prenant la forme d'un « bouquet de tulipes » (Wright, 2005). La protéine SP-D quant à elle s'assemble en dodécamère (~516 kDa) composé de 4 sous-unités trimériques associées entre elles par des ponts disulfures au niveau des extrémités N-terminales, le tout prenant l'aspect d'une croix. L'activité antimicrobienne de SP-A et SP-D est associée au domaine CRD qui, en présence de calcium, interagit avec des motifs oligosaccharidiques tels que la N-acetylmannosamine, le L-fucose, l'inositol, le maltose et le glucose présents à la surface de nombreuses bactéries, virus et cellules fongiques (Haagsman *et al.*, 1987; Persson *et al.*, 1990; Lim *et al.*, 1994). L'opsonisation des micro-organismes pathogènes et leur agglutination par les protéines SP-A et SP-D va inhiber leur croissance et favoriser leur phagocytose par les macrophages alvéolaires (Kuroki *et al.*, 2007). Il a été montré que ces deux collectines possèdent également une activité bactéricide contre *E. coli*, et fongicide contre *M. capsulatum* (Wu *et al.*, 2003; McCormack *et al.*, 2003).

2.4.1. Autres PAMs

2.4.1.1. La BPI

La BPI (*bactericidal/permeability increasing protein*) est une protéine de 55 kDa (charge nette : +12, pI : 9,4) d'environ 460 résidus constituée de deux domaines : un domaine N- et C-terminal, dont la taille et la structure tridimensionnelle sont proches, l'ensemble adoptant la forme d'un « boomerang » (Beamer *et al.*, 1997). Elle est principalement exprimée par les neutrophiles et dans une moindre mesure par les éosinophiles (Elsbach, 1998; Schultz & Weiss, 2007). La BPI est majoritairement active contre les bactéries à Gram négatif en raison de sa forte affinité pour le LPS. L'activité bactéricide de la BPI est portée par son domaine N-terminal cationique (charge nette : +15) (Elsbach & Weiss, 1998; Elsbach, 1998). Le domaine C-terminal anionique (charge nette : -2) est quant à lui impliqué dans les propriétés d'opsonisation de la BPI, permettant la phagocytose des microorganismes pathogènes par les neutrophiles.

2.4.1.2. La lactoperoxydase

La lactoperoxydase est une enzyme d'environ 80 kDa appartenant à la famille des oxydoréductases (EC 1.11.1.7) et joue un rôle important dans l'activité antimicrobienne des sécrétions bronchiques (Gerson *et al.*, 2000). La lactoperoxydase est présente dans les sécrétions bronchiques à des concentrations comprises entre 40 et 150 nM et catalyse à partir d'ions thiocyanates (SCN⁻) et du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) la formation d'ions hypothiocyanites (OSCN⁻), toxiques pour les membranes des microorganismes (Ratner & Prince, 2000; Wijkstrom-Frei *et al.*, 2003). La lactoperoxydase est notamment active contre *P. aeruginosa*, *B. cepacia*, *H. influenzae*, ainsi que le VIH et la levure *C. albicans* (Pourtois *et al.*, 1991; Lenander-Lumikari, 1992; Wijkstrom-Frei *et al.*, 2003).

2.4.1.3. La chimiokine MIP-3α

La chimiokine MIP-3α (*macrophage inflammatory protein-3α*) est un peptide cationique de 7,9 kDa (charge nette : +8, pI : 9,7) qui présente des similarités structurales et fonctionnelles avec les β-défensines (Starner *et al.*, 2003). Elle est exprimée par les cellules épithéliales pulmonaires à des concentrations d'environ 10 nM notamment après induction par des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1β et le TNF-α. MIP-3α présente une activité antibactérienne comparable à celle des β-défensines HBD-1 et -2 notamment contre *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *M. catharralis*, et *S. pyogenes* (Hoover *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2003).

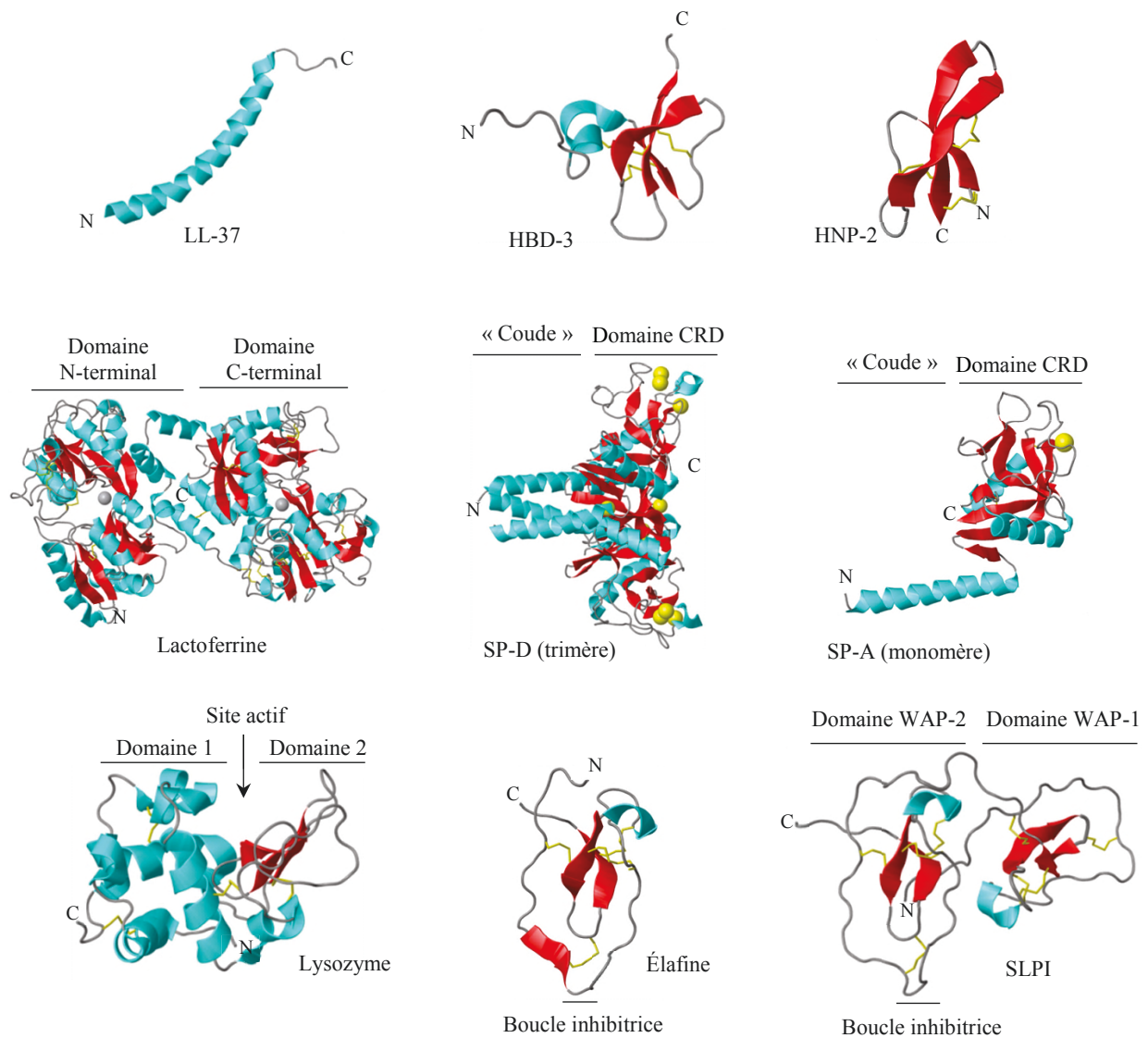


Figure 25 : Structure tridimensionnelle des principaux PAMs pulmonaires

Représentation en ruban du LL-37 (pdb 1k6o), de la HBD-3 (pdb 1kj6), de la HNP-2 (pdb 1zmf), de la lactoferrine (pdb 1blf), de la collectine SP-D (trimère, pdb 4m18), de la collectine SP-A (monomère, pdb 3pbf), du lysozyme (pdb 3fe0), de l'élafine (pdb 1fle), et du SLPI (issue de la structure du complexe entre le SLPI et la chymotrypsine établie par W. Bode, Max Planck Institut für Biochemie, Martinsried, Allemagne et fournie par Thierry Moreau, INSERM U1100, Tours, France). Les lignes jaunes représentent les ponts disulfures, les sphères jaunes représentent les ions Ca^{2+} et les sphères grises représentent les ions Fe^{3+} .

Tableau 10 : Propriétés physico-chimiques, expression, concentration, régulation et activité des PAMs pulmonaires

L'activité antimicrobienne est notée de la façon suivante : G+/- : bactéries à Gram positif/négatif ; V : virus ; F : cellules fongiques ; P : parasites

Peptide	Poids moléculaire ^a (kDa)	pI ^a / Charge nette ^a	Localisation	Concentration pulmonaire physiologique	Expression	Activité	Références
Lysozyme	14,3	10,5 +8	Neutrophiles, monocytes, macrophages, cellules épithéliales pulmonaires	20 – 70 µM	Constitutive	G+, G-, F	(Johnson and Phillips, 1965; Brogan <i>et al.</i> , 1975; Harbitz <i>et al.</i> , 1984; Ganz, 2004; Dubin <i>et al.</i> , 2004)
Lactoferrine	78,2	8,5 +11	Neutrophiles, cellules épithéliales des glandes submucosales	1 – 10 µM	Constitutive	G+, G-, F, V, P	(Brogan <i>et al.</i> , 1975; Harbitz <i>et al.</i> , 1984; Ganz, 2004; Dubin <i>et al.</i> , 2004; Baker and Baker, 2005)
Trappine-2 / Élafine	9,9 / 6	9 / 8,5 +7 / +3	Macrophages alvéolaires, neutrophiles, cellules de Clara, pneumocytes de type II, cellules épithéliales bronchiques	1,5 – 4,5 µM	Induite par IL-1β, TNF-α, LPS, élastase de neutrophile	G+, G-, F, V	(Sallenave <i>et al.</i> , 1992; Nara <i>et al.</i> , 1994; Sallenave <i>et al.</i> , 1994; Baranger <i>et al.</i> , 2008)
α-défensines (HNP 1-3)	~3,4	8,3 à 8,7 +2 à +3	Neutrophiles	~1 µM	Constitutive	G+, G-, F, V, P	(Ganz <i>et al.</i> , 1985; Ganz <i>et al.</i> , 1990; Harwig <i>et al.</i> , 1994)
SLPI	11,7	9.1 +12	Macrophages alvéolaires, neutrophiles, cellules de Clara, cellules caliciformes	~0.5 µM	Constitutive ↑ par HNPs, IL-1β, TNF- α, LPS, HNE	G+, G-, F, V	(Seemüller <i>et al.</i> , 1986; Vogelmeier <i>et al.</i> , 1991; Lee <i>et al.</i> , 1993; Kouchi <i>et al.</i> , 1993; Ranganathan <i>et al.</i> , 1999; Hiemstra, 2002; Weldon and Taggart, 2007; Scott <i>et al.</i> , 2011)
LL-37	4,5	10,6 +6	Neutrophiles, macrophages alvéolaires, cellules épithéliales des glandes submucosales et cellules bronchiques	0,5 – 10 nM	Constitutive ↑ par vitamine D, TNF-α, IFN-γ, IL-17A	G+, G-, F, V, P	(Koeffler <i>et al.</i> , 1985; Bals, Wang, Zasloff, <i>et al.</i> , 1998; Robert Bals <i>et al.</i> , 1999; Lysenko <i>et al.</i> , 2000; Agerberth <i>et al.</i> , 2000; Nizet <i>et al.</i> , 2001; Chen <i>et al.</i> , 2004; Peric <i>et al.</i> , 2008; Kim <i>et al.</i> , 2009)
SP-A (monomère)	34	5,0 (CRD) -3 (CRD)	pneumocytes de type II, cellules de Clara	1 - 5 nM	Constitutive ↑ par glucocorticoïdes, IL-1, IL-4, IFN-γ, TNF-α	G-, F	(Boggaram <i>et al.</i> , 1989; Haddad <i>et al.</i> , 1996; Dulkerian <i>et al.</i> , 1996; Crouch, 1998; Zhu <i>et al.</i> , 1998; Ikegami <i>et al.</i> , 2000; Seppänen <i>et al.</i> , 2005; Fujita <i>et al.</i> , 2005)
SP-D (monomère)	43	4,7 (CRD) -5 (CRD)					
β-défensines (HBD 1-3)	3,9 à 5,2	8,9 à 10,1 +4 to +11	Cellules épithéliales des glandes submucosales et cellules bronchiques	0,2 - 2 nM	HBD-1: constitutive ↑ par IFN-γ HBD-2: induite par IL-1β, IL-17, TNF-α HBD-3: induite par IL-1β, IL-6, IFN-γ	G+, G-, F, V	(Bals, Wang, Wu, <i>et al.</i> , 1998; Singh <i>et al.</i> , 1998; Selsted and Ouellette, 2005; Herr <i>et al.</i> , 2007)

^aCalculé à partir de la séquence en acide aminés via ProtParam (www.expasy.org/protparam/).

2.5. Fonctions immuno-modulatrices des PAMs pulmonaires

2.5.1. Neutralisation du LPS

La plupart des PAMs neutralisent le LPS qui est une endotoxine issue de la paroi des bactéries à Gram négatif. La stimulation exacerbée des cellules de l'immunité telles que les macrophages par des quantités importantes de LPS libre aboutit à une sécrétion massive de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6), provoquant ainsi une réponse inflammatoire aigüe potentiellement létale appelée choc endotoxique. Les PAMs pulmonaires (lactoferrine, lysozyme, SLPI, élafine, collectines SP-A et SP-D, LL-37 et α - et β -défensines) sont capables de se lier au LPS, neutralisant ainsi son activité pro-inflammatoire (Ohno and Morrison, 1989; Appelmelk *et al.*, 1994; Ding *et al.*, 1999; Scott *et al.*, 2002; McMichael *et al.*, 2005; García-Verdugo *et al.*, 2005; Yamazoe *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010).

2.5.2. Chimiotactisme

L'activité chimiotactique des PAMs est principalement portée par le LL-37 et les α - et β -défensines. Les α - et β -défensines possèdent une activité chimio-attractante vis-à-vis des macrophages, des monocytes, des mastocytes et des lymphocytes T (Yang *et al.*, 1999; D. Yang *et al.*, 2001; Niyonsaba *et al.*, 2002; Grigat *et al.*, 2007). L'activité chimiotactique des β -défensines est dépendante de leur liaison au récepteur CCR6 (*C-C chemokine receptor 6*) couplé aux protéines-G, en revanche le récepteur des α -défensines n'est pas connu (Yang *et al.*, 1999; D. Yang *et al.*, 2001; Grigat *et al.*, 2007). Le LL-37 stimule le recrutement des neutrophiles, des éosinophiles, des monocytes et des lymphocytes T en interagissant avec le récepteur couplé aux protéines-G ; FPRL-1 (*formyl peptide receptor like-1*) (D. Yang *et al.*, 2001; Tjabringa *et al.*, 2006). Le LL-37 exerce également une activité chimiotactique indirecte en favorisant la production des facteurs chimio-attractants MCP-1 et MCP-3 (*monocyte chemoattractant protein*) par les monocytes (Yu *et al.*, 2007)

2.5.3. Modulation de l'expression de cytokines

Les peptides antimicrobiens exercent également un effet immuno-modulateur en régulant la production de cytokines pro- ou anti-inflammatoires par les cellules immunitaires. Les α -défensines (HNP-1 à -3) peuvent stimuler la production des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , IL-1 β et IFN- γ par les monocytes et les macrophages via un récepteur non identifié à

ce jour (Chaly *et al.*, 2000; Soehnlein *et al.*, 2008). Le LL-37 est capable de stimuler la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 β et l'IL-6 en interagissant avec le récepteur purinergique P₂X₇ (Elssner *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2007). Le SLPI favorise la production de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF- β et diminue l'expression de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6 et le TNF- α (Sano *et al.*, 2000; Greene *et al.*, 2004). Les collectines SP-A et SP-D, lorsqu'elles sont associées à des micro-organismes pathogènes, s'associent via leur domaine de type collagène au récepteur CD91 présent sur les macrophages alvéolaires et stimulent ainsi la production de facteurs pro-inflammatoires comme le TNF- α et MIP-2 (*macrophage inflammatory protein-2*) (Gardai *et al.*, 2003). A l'inverse, la même étude a montré que SP-A et SP-D non complexés à des pathogènes inhibent la production de facteurs pro-inflammatoires par les macrophages en se liant via leur domaine CRD au récepteur SIRP α (*signal regulatory protein α*).

2.6. Les PAMs dans les pathologies pulmonaires

Lors de pathologies pulmonaires inflammatoires comme la mucoviscidose ou la BPCO, les défenses antimicrobiennes sont souvent compromises, favorisant ainsi la colonisation du tissu pulmonaire par des micro-organismes pathogènes. Plusieurs facteurs sont à l'origine de ce phénomène comme la modification du pH et de la concentration en électrolytes des fluides épithéliaux, ou encore la présence de protéases actives, d'origine humaine ou bactérienne, susceptibles de dégrader et d'inactiver certains PAMs.

2.6.1. Inactivation indépendante de la protéolyse

2.6.1.1. Dans la mucoviscidose

Dans le contexte de la mucoviscidose, l'expression de certains PAMs pulmonaires est augmentée, notamment en réponse à l'infection chronique du tissu pulmonaire, cependant leur activité antimicrobienne est compromise (Sallenave *et al.*, 1997; Virella-Lowell *et al.*, 2000; Griese *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2005; Bergsson *et al.*, 2009; Sagel *et al.*, 2009). Il a été montré *in vitro* que des concentrations élevées en NaCl (0 à 300 mM) inactive les β -défensines HBD-1 et -2 (Goldman *et al.*, 1997; Bals, Wang, Wu, *et al.*, 1998; Bals *et al.*, 2001). L'activité bactéricide de HBD-1 vis-à-vis de *P. aeruginosa* est significativement diminuée chez les patients atteints de mucoviscidose par rapport à des individus sains (Goldman *et al.*, 1997). La sécrétion de molécules anioniques telles que l'ADN, les GAGs, les mucines ou encore la F-

actine est augmentée dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose (Vasconcellos *et al.*, 1994; Brandt *et al.*, 1995; Kirkham *et al.*, 2002; Reeves *et al.*, 2011). Il a été montré que le LL-37 peut se complexer avec l'ensemble de ces molécules anioniques, le rendant ainsi inactif vis-à-vis de *P. aeruginosa* et *S. aureus* (Weiner *et al.*, 2003; Bucki *et al.*, 2007; Bucki *et al.*, 2008; Bergsson *et al.*, 2009). L'utilisation de gelsoline (enzyme qui catalyse la dépolymérisation de l'actine), de DNase, de GAG-lyase, de neuraminidase ou encore de fortes concentrations en NaCl (jusqu'à 450 mM), dissocie les complexes et restore l'activité du LL-37 (Bergsson *et al.*, 2009). La mucoviscidose est également caractérisée par une légère acidification des fluides épithéliaux (pH 5,8 à 6,6) (Song *et al.*, 2006; Newport *et al.*, 2009). La diminution du pH à la surface de l'épithélium pulmonaire engendre un changement de conformation du LL-37, HBD-1, SLPI et des collectines SP-A et SP-D et altère leur capacité à interagir efficacement avec les membranes des agents pathogènes (McNeely *et al.*, 1997; Johansson *et al.*, 1998; Nakayama *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2003). Enfin l'acidification du milieu extracellulaire a aussi pour conséquence de perturber les phénomènes de synergie antimicrobienne, notamment entre le LL-37, le lysozyme et HBD-3 (Abou Alaiwa *et al.*, 2014).

2.6.1.2. Dans la BPCO

Les concentrations pulmonaires de certains PAMs (α - et β -défensines, LL-37, SLPI, élafine collectines) sont augmentées chez les patients atteints de BPCO stable comparé à des individus sains (Xiao *et al.*, 2005; Ohlmeier *et al.*, 2008; Tsoumakidou *et al.*, 2010; Ishikawa *et al.*, 2011; Paone *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2012). Cependant, il a été montré d'une part que le tabagisme actif favorise les infections pulmonaires, et d'autre part que les poumons d'individus souffrant de BPCO stable sont colonisés par des pathogènes tels que *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* ou encore *H. influenzae* (Monsó *et al.*, 1995; Zalacain *et al.*, 1999; Sethi and Murphy, 2008; Almirall *et al.*, 2014). L'expression de HBD-2 par les cellules bronchiques après stimulation par *M. catarrhalis* et *P. aeruginosa* est inhibée par la fumée de cigarette (Herr *et al.*, 2009; Weiyun Zhang *et al.*, 2011). De plus, les concentrations pulmonaires du SLPI et de l'élafine sont diminuées dans les phénomènes d'exacerbation de la BPCO, favorisant ainsi l'infection par *M. catarrhalis* et *H. influenzae* (Sallenave *et al.*, 1997; Parameswaran *et al.*, 2011; Mallia *et al.*, 2012). Le LL-37 peut subir des modifications post-traductionnelles dans les poumons de patients fumeurs suite à l'augmentation de l'expression des peptidylarginine déiminases (PAD), des enzymes catalysant la conversion des arginines cationiques des peptides et protéines en citrullines non

chargées (Kilsgård *et al.*, 2012; Koziel *et al.*, 2014). Le LL-37 sous forme citrullinée perd ses propriétés antimicrobiennes et immuno-modulatrices. Bien que l'ensemble de ces données suggèrent un rôle du stress oxydatif lié à la fumée de cigarette dans la perturbation de l'activité des défenses antimicrobiennes, les mécanismes moléculaires impliqués dans ce phénomène restent peu connus à ce jour.

2.6.2. Inactivation protéolytique

2.6.2.1. Par les protéases bactériennes

Certaines bactéries sécrètent des protéases capables de dégrader et d'inactiver les peptides antimicrobiens pulmonaires. La cathélicidine LL-37 est la cible de nombreuses protéases bactériennes telles que l'élastase de *P. aeruginosa*, l'auréolysine et la protéase V8 de *S. aureus*, la streptopaïne de *S. pyogenes*, la gingipaïne de *P. gingivalis* ou encore la mirabylisine de *P. mirabilis* (Schmidtchen *et al.*, 2002; Belas *et al.*, 2004; Sieprawska-Lupa *et al.*, 2004; McCrudden *et al.*, 2013). Il a été montré que l' α -défensine HNP-1 et les β -défensines-1, -2 et -3 sont dégradées après incubation dans des surnageants de culture de *P. gingivalis*, suggérant un rôle de la gingipaïne dans la dégradation de ces peptides (Carlisle *et al.*, 2009). Les collectines SP-A et SP-D sont dégradées par l'élastase et la protéase IV de *P. aeruginosa*, ainsi que par la staphopaïne A de *S. aureus* (Mariencheck *et al.*, 2003; Malloy *et al.*, 2005; Kantyka *et al.*, 2013). La dégradation protéolytique du SP-A permet notamment à la bactérie *P. aeruginosa* d'échapper à la phagocytose par les macrophages (Kuang *et al.*, 2011). En plus des protéases sécrétées dans le milieu extracellulaire, certaines bactéries expriment des protéases associées à la paroi appartenant à la famille des OMPs (*Outer membrane proteins*). C'est le cas notamment des protéases OmpE de *S. typhimurium* et OmpT d'*E. coli*, capables de cliver et d'inactiver le peptide LL-37 (Guina *et al.*, 2000; Thomassin *et al.*, 2012).

2.6.2.2. Par les protéases humaines pulmonaires

En conditions inflammatoires, le déséquilibre de la balance protéases-antiprotéases en faveur de la protéolyse peut entraîner la dégradation et l'inactivation de certains PAMs pulmonaires par les protéases de l'hôte. L'HNE clive SP-D au niveau de son domaine CRD, supprimant ainsi ses propriétés d'agglutination bactérienne (Griese *et al.*, 2003; Hirche *et al.*, 2004). Le SP-D est également clivé par la MMP-9, mais conserve sa capacité de liaison au LPS (Bratcher *et al.*, 2012). Les cathepsines à cystéine participent également à la dégradation et l'inactivation de SP-A et SP-D. La cathepsine C dégrade le SP-D, favorisant la survie de la

bactérie *K. pneumoniae* (Sutherland *et al.*, 2014). En revanche, les produits de clivage de SP-D conservent leurs propriétés immuno-modulatrices (Gardai *et al.*, 2003; Cooley *et al.*, 2008). La cathepsine S inactive les propriétés d'agglutination de SP-A vis-à-vis d'*E. coli* et *P. aeruginosa* par clivage au niveau de son domaine CRD (Lecaille *et al.*, 2013). De plus, il a été montré *in vitro* que le calcium protège les collectines de la protéolyse de façon dose dépendante (Ruano *et al.*, 2000). L'interaction des collectines avec les ions Ca^{2+} engendre un changement de conformation limitant l'accès du domaine CRD aux protéases. Outre les protéases bactériennes, LL-37 est également la cible de protéases humaines. Il a notamment été montré que l'HNE et la cathepsine D (protéase acide) dégradent le peptide LL-37 dans des expectorations de patients atteints de mucoviscidose (Bergsson *et al.*, 2009). Cependant, dans ces mêmes expectorations, le LL-37 complexé avec des GAGs est résistant à la protéolyse. Les β -défensines HBD-2 et -3, pourtant connues pour être résistantes à la protéolyse, sont clivées et inactivées de manière efficace par les cathepsines B, L et S (Taggart *et al.*, 2003). De la même manière, la lactoferrine dégradée par les cathepsines B, L et S perd son activité anti-biofilm vis-à-vis de *P. aeruginosa* (Rogan *et al.*, 2004). Enfin, le SLPI incubé dans des échantillons de patients atteints d'emphysème est clivé au niveau de son domaine inhibiteur par les cathepsines B, L et S (Taggart *et al.*, 2001). Bien que les conséquences sur l'activité antimicrobienne du SLPI n'aient pas été démontrées, la perte du contrôle de l'activité protéolytique de l'HNE peut favoriser la dégradation d'autres peptides antimicrobiens comme l'élafine (Guyot *et al.*, 2008).

3. Objectifs de la thèse

Les pathologies inflammatoires pulmonaires sont des maladies caractérisées par un déséquilibre de la balance protéase/antiprotéases en faveur de la protéolyse et par une dégradation du parenchyme pulmonaire. La majorité des stratégies thérapeutiques envisagées à l'heure actuelle se focalisent majoritairement sur les protéases à sérines (HNE, CatG et Pr3) et les métalloprotéases (MMP-2, -9 et -12). Cependant, les cathepsines à cystéine participent aux côtés des protéases à sérine et des métalloprotéases à l'entretien de la chronicité de la réaction inflammatoire lors de pathologies pulmonaires comme la mucoviscidose, la silicose, la fibrose pulmonaire ou la sarcoïdose (Lalmanach *et al.*, 2015). Outre les protéines de la matrice extracellulaire et de la membrane basale, les cathepsines à cystéine sont également capables de dégrader et d'inactiver des peptides et protéines antimicrobiens (PAMs) pulmonaires (pour revue: **Annexe 1**) comme les β -défensines 2 et -3, la lactoferrine, la protéine du surfactant SP-A (**Annexe 2**) et le SLPI (Taggart *et al.*, 2001; Taggart *et al.*, 2003; Rogan *et al.*, 2004; Lecaille *et al.*, 2013).

La cathélicidine LL-37 qui est un PAM important dans l'immunité innée pulmonaire est dégradée et inactivée par l'HNE et la cathepsine D (protéase acide) dans le contexte de la mucoviscidose et n'a pas été décrite comme un substrat potentiel des cathepsines à cystéine (Bergsson *et al.*, 2009).

La première partie de mes travaux de thèse a eu pour objectif de caractériser le clivage protéolytique de LL-37 par les cathepsines B, L, K et S et les conséquences sur son activité antimicrobienne. Pour cela nous avons dans un premier temps examiné la dégradation du LL-37 par les cathepsines à cystéine dans des échantillons biologiques (expectorations de patients atteints de mucoviscidose, échantillons issus de macrophages alvéolaires). La capacité individuelle des cathepsines B, K, L et S à cliver LL-37 a ensuite été évaluée en présence ou non de différents GAGs. D'autre part, il a été montré que le peptide LL-37 diminue l'activité endopeptidasique de la cathepsine L vis-à-vis d'un substrat fluorogénique (Pazgier *et al.*, 2013). Cependant, cette étude n'a pas montré si l'effet du LL-37 sur l'activité de la cathepsine L est lié à l'inhibition de l'enzyme par le peptide ou à une compétition de substrat. Nous avons donc procédé à la caractérisation enzymologique de l'inhibition de la cathepsine L par le LL-37 (**Article 1**).

La BPCO est une pathologie pulmonaire associée principalement au tabagisme et dans laquelle l'inflammation chronique du poumon est souvent liée à des infections pulmonaires récurrentes d'origine bactérienne et virale. Des études préliminaires ont montré que les cathepsines B et L sont présentes et actives dans des lavages bronchoalvéolaires de patients fumeurs atteints de BPCO bien que le stress oxydatif induit par la fumée de cigarette constitue un environnement *a priori* défavorable pour ce type de protéases (Chang *et al.*, 1986; Reilly *et al.*, 1991; Takeyabu *et al.*, 1998). L'existence d'un état d'oxydation réversible de la cystéine du site actif (acide sulfénique, -SOH) pourrait expliquer ce phénomène (Owen, 2005; Hervé-Grépinet *et al.*, 2008; Godat *et al.*, 2008). A ce jour, la régulation de l'expression et l'activité des cathepsines à cystéine humaines et en particulier la cathepsine S par le stress oxydatif lors de la BPCO restent encore peu décrits.

La deuxième partie de mes travaux de thèse a consisté à caractériser l'expression et l'activité des cathepsines à cystéine dans la BPCO chez l'Homme. Nous avons dans un premier temps, analysé l'expression des cathepsines B, H, K, L et S dans des échantillons pulmonaires (expectorations et tissus) de patients fumeurs atteints ou non de BPCO et nous avons également étudié leur expression en fonction des stades de sévérité (GOLD I à GOLD III). Nous nous sommes focalisés sur la cathepsine S, puisqu'il a été montré qu'elle joue un rôle dans l'inflammation pulmonaire liée au stress oxydatif chez la souris (Williams *et al.*, 2009). L'expression de la cathepsine S a été étudiée également dans des cellules primaires humaines épithéliales bronchiques (pHBECs) traitées ou non à la fumée de cigarette et nous avons étudié sa capacité à dégrader le LL-37 (**Article 2**, en préparation).

II- Travaux personnels

1. Régulation de la cathélicidine LL-37 par les cathepsines à cystéine humaines B, K, L et S

Article 1: Antimicrobial Peptide LL-37 Is Both a Substrate of Cathepsins S and K and a Selective Inhibitor of Cathepsin L

Pierre-Marie Andrault, Sergey A. Samsonov, Gunther Weber, Laurent Coquet, Kamran Nazmi, Jan G. M. Bolscher, Anne-Christine Lalmanach, Thierry Jouenne, Dieter Brömme, M. Teresa Pisabarro, Gilles Lalmanach & Fabien Lecaille

Biochemistry 2015, 54, 2785–2798

Introduction : L'épithélium pulmonaire est constamment exposé à des pathogènes contenus dans l'air inspiré. Outre les défenses mécaniques que constituent la production de mucus et la clairance muco-ciliaire, les cellules de l'immunité et les cellules épithéliales pulmonaires sécrètent tout un arsenal de peptides et de protéines à activité antimicrobienne (PAM). Les PAMs exprimés au niveau pulmonaires comprennent le SLPI (*Secretory Leucocyte Peptidase Inhibitor*), le lysozyme, la lactoferrine, les protéines du surfactant SP-A et SP-D, les α - et β -défensines et la cathélicidine LL-37 (Rogan *et al.*, 2006). Lors de pathologies inflammatoires pulmonaires comme la mucoviscidose (CF), l'activité antimicrobienne des PAMs est compromise (Smith *et al.*, 1996; Goldman *et al.*, 1997). Le peptide cationique LL-37 est présent en concentration élevée (~15 $\mu\text{g/mL}$) dans les lavages bronchoalvéolaires de patients CF (Chen *et al.*, 2004; Xiao *et al.*, 2005). Cependant son activité antimicrobienne est inhibée suite à la complexation avec de nombreuses molécules anioniques comme l'ADN, l'actine filamenteuse, les mucines ou encore les GAGs, présentes dans les poumons des patients CF (Weiner *et al.*, 2003; Bucki *et al.*, 2007; Bucki *et al.*, 2008; Bergsson *et al.*, 2009). D'autre part, le LL-37 peut également subir une inactivation protéolytique par des protéases bactériennes comme l'élastase de *P. aeruginosa* ou l'auréolysine de *S. aureus* ou par des protéases humaines comme l'élastase de neutrophile (HNE) et la cathepsine D (protéase acide) (Schmidtchen *et al.*, 2002; Bergsson *et al.*, 2009). Les cathepsines à cystéine B, L et S sont capables de cliver et d'inactiver des PAMs pulmonaires comme le SLPI, la lactoferrine ou les β -défensines HBD-2 et -3 (Taggart *et al.*, 2001; Taggart *et al.*, 2003; Rogan *et al.*, 2004). Cependant, aucune étude n'a décrit le LL-37, qui est un PAM pulmonaire important, comme substrat biologique des cathepsines à cystéine humaines.

Objectif: Les principaux objectifs de ce travail sont: 1) l'identification et la caractérisation des cathepsines à cystéine pulmonaires capables d'hydrolyser le peptide LL-37 et les conséquences sur son activité antimicrobienne; 2) l'analyse du potentiel inhibiteur du LL-37 vis-à-vis de la cathepsine L.

Résultats : Nous avons dans un premier temps confirmé l'expression du LL-37 et de son précurseur hCAP-18 dans des expectorations de patients CF colonisés et non colonisés par *P. aeruginosa*. Après incubation dans le milieu réactionnel des cathepsines, le peptide LL-37 est dégradé au bout de 24 heures et l'hydrolyse est bloquée en présence d'E-64, un inhibiteur sélectif des cathepsines à cystéine. Les mêmes observations ont été faites après incubation du LL-37 synthétique avec des échantillons de macrophages alvéolaires. L'étude *in vitro* de l'hydrolyse du LL-37 par les cathepsines B, K, L et S à différents ratios molaires substrat/enzyme (S/E) a montré que le LL-37 est dégradé de façon efficace par les cathepsines K et S (S/E : 17600) et dans une moindre mesure par la cathepsine B tandis que la cathepsine L n'hydrolyse pas le LL-37. L'analyse des fragments d'hydrolyse du LL-37 par spectrométrie de masse MALDI-TOF a mis en évidence plusieurs sites de clivages communs aux cathepsines K et S, répartis sur toute la séquence du peptide. La cathepsine B possède deux sites préférentiels de clivage. Il a été montré que les GAGs se complexent avec le LL-37 et protègent ainsi ce dernier contre la protéolyse dans des expectorations de patients CF (Bergsson *et al.*, 2009). Nous avons donc étudié l'influence de certains GAGs sulfatés comme le chondroïtine 4-sulfate (C4-S), l'héparane sulfate (HS) et l'héparine (HP) et non sulfatés comme l'acide hyaluronique (HA) sur l'hydrolyse du LL-37 par les cathepsines K et S. Seul les GAGs sulfatés : C4-S, HS, et HP bloquent de façon dose dépendante l'hydrolyse du LL-37. L'effet protecteur des GAGs sulfatés est compromis en présence de NaCl, indiquant que des interactions électrostatiques sont impliquées entre le LL-37 et les GAGs. Nous avons ensuite étudié les conséquences de la dégradation du LL-37 sur son activité antimicrobienne. Contrairement aux cathepsines B et L, lorsque le LL-37 est incubé avec la cathepsine K ou S (S/E : 4500), celui-ci perd son activité antimicrobienne vis-à-vis d'*E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Cependant, lorsque le peptide LL-37 est incubé avec une concentration plus faible en cathepsine K ou S (S/E : 17600), un fragment peptidique (DF-22) est généré suite à cette protéolyse ménagée et qui possède des propriétés antimicrobiennes comparables à celles du LL-37. L'analyse de la structure secondaire par dichroïsme circulaire du peptide DF-22 a montré que ce peptide ne se structure pas en hélice- α (pH 5,5 et 7,4), contrairement à LL-37. Ces observations suggèrent que l'activité antimicrobienne de DF-22 est indépendante de sa

structure secondaire en solution. D'autre part, il a été montré que le LL-37 diminue l'activité peptidasique de la cathepsine L, cependant ces travaux n'ont pas montré si cette observation est liée à l'inhibition de la cathepsine L par LL-37 ou s'il s'agit d'une inhibition apparente due à une compétition de substrat (Pazgier *et al.*, 2013). Nous avons confirmé que le LL-37 inhibe la cathepsine L de façon spécifique et n'a aucun effet sur les cathepsines B, K et S. Le peptide LL-37 inhibe la cathepsine L selon un mécanisme compétitif, réversible et présente une valeur de constante d'inhibition (K_i) de 150 nM. L'inhibition est dépendante des interactions électrostatiques puisque le NaCl (0 à 1 M) lève l'inhibition de façon dose dépendante. Nous avons voulu savoir s'il existait une séquence minimale inhibitrice du LL-37 vis-à-vis de la cathepsine L. Pour cela nous avons testé plusieurs peptides dérivés du LL-37 tronqués soit du côté N-terminal, soit du côté C-terminal soit des deux côtés. Ces expériences ont montré d'une part que toute la séquence du LL-37 est importante et que d'autre part le côté N-terminal du LL-37 a un impact majeur dans l'inhibition de la cathepsine L. Ensuite, nous avons analysé la sélectivité de l'inhibition de la cathepsine L par le LL-37. Étant donné que l'un des déterminants majeurs de la sélectivité enzymatique des cathepsines est la poche S2 du site actif (Choe *et al.*, 2006), une approche de mutagénèse dirigée nous a permis d'identifier deux résidus critiques du site actif de la cathepsine L (résidus 67 et 205) impliqués dans l'interaction avec le LL-37. La modélisation par bio-informatique du docking du LL-37 avec la cathepsine L montre que celui-ci se positionne au niveau du site actif de l'enzyme et que le peptide adopte deux positions différentes dans le site actif. Le LL-37 se positionne via des interactions électrostatiques dans le site actif de l'enzyme de la même manière qu'un substrat et peut également s'orienter de façon inversée par rapport à la position de type substrat. Ce résultat prédictif a été confirmé *in vitro* à l'aide d'un peptide synthétique : SE-37, qui est un peptide dont la séquence de N-terminal vers C-terminal est inversée par rapport à celle du LL-37. De façon intéressante, SE-37 inhibe la cathepsine L avec une valeur de K_i comparable à celle du LL-37 (100 nM). Nous avons émis l'hypothèse que la position inversée du LL-37 lui confère sa résistance à la protéolyse, de la même manière que le propeptide de la cathepsine L qui s'oriente également en position inversée dans le site actif de l'enzyme.

Conclusion : le LL-37 est un substrat potentiel des cathepsines K et S et un inhibiteur sélectif de la cathepsine L. La dégradation du LL-37 par les cathepsines K et S pourrait être un moyen physiologique de réguler son activité antimicrobienne et également de limiter la cytotoxicité du LL-37 pour les cellules eucaryotes lorsque celui-ci est présent à des concentrations élevées (10 à 100 μ M) (Johansson *et al.*, 1998; Tjabringa *et al.*, 2005; Nan *et al.*, 2012). Ainsi, les

cathepsines à cystéine participent à l'inactivation protéolytique du LL-37 aux côtés d'autres PAMs comme le SLPI, les α - et β -défensines, la lactoferrine et la protéine du surfactant SP-A. Cependant, les GAGs présents dans les poumons de patients atteints de mucoviscidose ont un effet protecteur spécifique du LL-37 alors que, d'autres peptides antimicrobiens comme la β -défensine HBD-2 et le SP-A sont retrouvés dégradés (**Figure 26**). Ces observations suggèrent donc une régulation protéolytique fine des différents peptides antimicrobiens par les cathepsines pulmonaires, notamment lors de pathologies inflammatoires telles que la mucoviscidose. Il serait intéressant d'étudier ce phénomène dans d'autres pathologies inflammatoires pulmonaires s'accompagnant d'une colonisation bactérienne comme la BPCO par exemple.

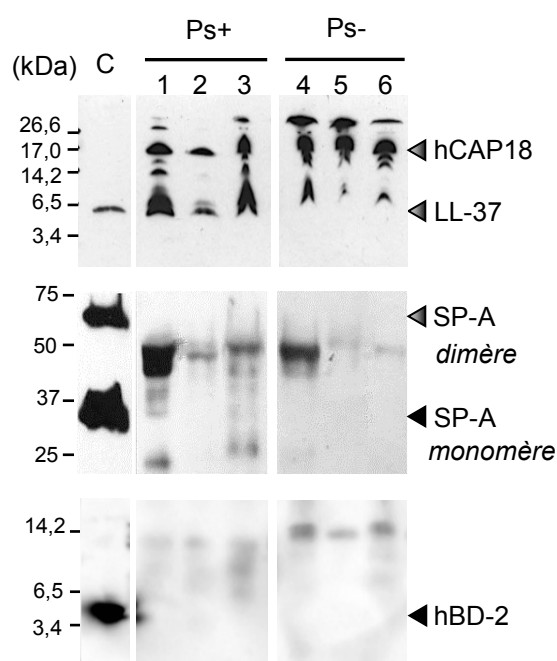


Figure 26 : Statut du LL-37/hCAP-18, du SP-A et de la β -défensine HBD-2 dans des expectorations de patients atteints de mucoviscidose colonisés (Ps+) ou non (Ps-) par *P. aeruginosa*. (résultats personnels)

Antimicrobial Peptide LL-37 Is Both a Substrate of Cathepsins S and K and a Selective Inhibitor of Cathepsin L

Pierre-Marie Andraut,[†] Sergey A. Samsonov,[‡] Gunther Weber,[§] Laurent Coquet,^{||} Kamran Nazmi,[⊥] Jan G. M. Bolscher,[⊥] Anne-Christine Lalmanach,[#] Thierry Jouenne,^{||} Dieter Brömme,[○] M. Teresa Pisabarro,[‡] Gilles Lalmanach,[†] and Fabien Lecaillon^{*,†}

[†]INSERM, UMR 1100, Pathologies Respiratoires: protéolyse et aérosolthérapie, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, Equipe 2: "Mécanismes Protéolytiques dans l'Inflammation", Université François Rabelais, F-37032 Tours cedex, France

[‡]Structural Bioinformatics, BIOTEC TU Dresden, Tatzberg 47-51, 01307 Dresden, Germany

[§]INSERM, UMR 1069, Nutrition Croissance et Cancer, Université François Rabelais, F-37032 Tours cedex, France

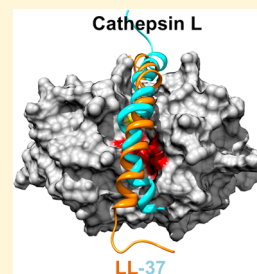
^{||}CNRS UMR 6270, Plate-forme de Protéomique "PISSARO" de l'IRIB, Université de Rouen, F-76821 Mont-Saint Aignan, France

[⊥]Department of Oral Biochemistry, Academic Centre for Dentistry Amsterdam, University of Amsterdam and VU Universiteit Amsterdam, 1081 LA, Amsterdam, The Netherlands

[#]INRA, UMR 1282 Infectiologie et Santé Publique, Université François Rabelais, F-37380 Nouzilly, France

[○]Department of Oral Biological and Medical Sciences, The University of British Columbia, Vancouver, British Columbia V6T1Z3, Canada

ABSTRACT: Lung cysteine cathepsins B, K, L, and S contribute to physiological and pathological processes including degradation of antimicrobial peptides/proteins (AMPs) such as surfactant protein SP-A, lactoferrin, secretory leukocyte peptidase inhibitor, and beta-defensins-2 and -3. Substantial amounts of uncleaved LL-37, a 37-mer cationic AMP, were observed in the sputum of patients with cystic fibrosis (CF). Nevertheless LL-37 was degraded after prolonged incubation in CF sputum, and the hydrolysis was blocked by E-64, a selective inhibitor of cysteine proteases. Cathepsins K and S, expressed in human alveolar macrophages, thoroughly hydrolyzed LL-37 *in vitro*, whereas it competitively inhibited cathepsin L ($K_i = 150$ nM). Cleavage of LL-37 by cathepsins S and K impaired its antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, in a time- and concentration-dependent manner. The exchange of residues 67 and 205 in the S2 pockets of cathepsins L (Leu67Tyr/Ala205Leu) and K (Tyr67Leu/Leu205Ala) switched the specificity of these mutants toward LL-37. Molecular modeling suggested that LL-37 interacted with the active site of cathepsin L in both forward (i.e., substrate-like) and reverse orientations with similar binding energies. Our data support the hypothesis that cysteine cathepsins modulate the innate immunity response by degrading distinct and representative members of the AMP family.



The human airway epithelium is constantly exposed to a myriad of potential airborne pathogens and therefore constitutes an essential frontline of the host defense against infections. To prevent microbial colonization, the lung epithelial lining fluid displays an arsenal of effective antimicrobial proteins and polypeptides (AMPs) that include larger proteins such as lysozyme, lactoferrin, surfactant proteins, the secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), as well as cationic peptides such as human β -defensins (hBD) and cathelicidin LL-37. In addition to their broad-spectrum antimicrobial activity against a range of bacteria, fungi, and viruses, AMPs play a key role in the modulation of innate and adaptive immunity and in wound repair (for review, see refs 1 and 2). However, the activity of some AMPs, such as SLPI, hBD-2 and -3, SP-A, and LL-37, may be impaired in airway inflammatory diseases like cystic fibrosis (CF) due to their susceptibility to proteolytic degradation by opportunistic pathogens including *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* as well as by host proteases.^{3–5} LL-37 activity may also be impaired in CF due to interactions with anionic filamentous

(F)-actin,⁶ DNA,⁷ glycosaminoglycans,^{8,9} and mucins,¹⁰ which inhibit its antimicrobial activity and protect it from proteolysis. Indeed, an elevated concentration of LL-37, reaching levels of 15 μ g/mL, is observed in the bronchoalveolar lavage fluid of CF patients and is correlated with pulmonary inflammation and disease severity.^{11,12} Thus, the regulation of LL-37 during the pathogenesis of CF lung disease remains unclear and needs further investigation.

The only cathelicidin in humans is expressed as a 18-kDa precursor (hCAP18) that is expressed by various cell types (e.g., leukocytes, epithelial cells) and found in body fluids (e.g., BALF, saliva, plasma). hCAP18 consists of a highly conserved N-terminal prodomain (the cathelin-like domain, i.e., hCLD) and a cationic C-terminal domain that corresponds to LL-37.¹³ After secretion, the precursor is cleaved by kallikreins produced

Received: March 4, 2015

Revised: April 13, 2015

Published: April 17, 2015



in keratinocytes¹⁴ and proteinase 3 from neutrophils¹⁵ to generate LL-37. It is noteworthy that the lack of activation of proteinase 3 leads to an accumulation of hCAP18 in the gingiva and saliva of patients with Papillon–Lefèvre syndrome, favoring infection by pathogenic bacteria.¹⁶ Despite a cystatin-like fold, the cathelin-like domain possesses no apparent inhibitory activity against cysteine cathepsin L (CatL).¹⁷ Conversely, both LL-37 and hCAP18 reduce CatL activity in a dose-dependent manner, suggesting that the C-terminal of hCAP18 is critical in the inhibition. The positive charge and amphipathic α -helical secondary structure of LL-37 allow it to interact with negatively charged phospholipids of bacteria membrane, resulting in their permeabilisation by the formation of transmembrane pores and thus leading to bacterial lysis.¹⁸ Although the antimicrobial activity of LL-37 supports its potential use as a therapeutic agent against bacterial infection and inflammatory diseases, its effectiveness could be limited by specific proteases present in the CF lung.^{19,20} We and others reported that hBD-2 and -3, SLPI, lactoferrin, and SP-A are cleaved and inactivated in CF lungs by human cysteine cathepsins B, L, and S (CatB, L, and S).^{21–24} Cysteine cathepsins are produced by lung macrophages, fibroblasts, and epithelial cells and participate primarily in intracellular proteolytic pathways (for review, see ref 25). Cathepsins are also found to be extracellularly active as membrane-bound and soluble forms and contribute with other proteases to a variety of pathophysiological processes (for review, see refs 26 and 27). Overall, these observations raised the question whether LL-37 is an inhibitor, a substrate, or combines both functions toward cathepsins. Here, we evaluated the potential of CatB, K, L, and S to inactivate the antimicrobial function of LL-37 against Gram-negative and Gram-positive bacteria. Furthermore, we investigated the molecular mechanism of the inhibition of CatL by biochemical and molecular modeling studies.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Enzymes. Human Cats B, L, and S were supplied by Calbiochem (VWR International S.A.S., France). Human CatK, S2 cathepsin L-like (Tyr67Leu/Leu205Ala) mutant of CatK and S2 cathepsin K-like (Leu67Tyr/Ala205Leu) mutant of CatL were produced as described previously.²⁸ Human neutrophil elastase (HNE) was purchased from BioCentrum (Krakow, Poland). Active site concentrations of cathepsins were determined using L-3-carboxy-trans-2,3-epoxy-propionyl-leucylamide-(4-guanido)-butane (E-64) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). HNE titration was performed with α 1-antitrypsin (Boehringer Ingelheim, Reims, France) as previously described.²⁹

Substrates and Synthetic Inhibitors. Benzylloxycarbonyl-Phe-Arg-7-amino-4-methyl coumarin (Z-Phe-Arg-AMC) was purchased from Bachem (Bachem Biochimie, Voisin-le-Bretonneux, France). PMSF, pepstatin A, EDTA, AEBSEF (Pefabloc), and MMTS were from Sigma-Aldrich. N-(L-3-trans-Propylcarbamoyloxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline (CA-074) and DTT (DL-dithiotreitol) were from Calbiochem (VWR International S.A.S., France). Morpholinourea-leuciny-l-homophenylalanine-vinyl-sulfone phenyl inhibitor (LHVS) was a kind gift from Dr. J. H. McKerrrow (University of California, San Diego, La Jolla, CA, USA). Glycosaminoglycans: chondroitin 4-sulfate (C4-S) from bovine trachea (MW approx: 20–30 kDa), low molecular weight heparin (HP) from porcine intestinal mucosa (MW: 15–17 kDa), heparan sulfate (HS) from bovine kidney (MW approx: 14 kDa), hyaluronic acid

(HA) from *Streptococcus equi* (MW: 1400 kDa) were from Sigma-Aldrich. Purified GAGs were diluted in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5 at 3 mg/mL. All other reagents were of analytical grade.

Synthetic Peptides. Unless otherwise stated, all peptides were of L-configuration. LL-37 (LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLNLRVPRTES), D-LL-37 (amino acids were of D-configuration) and scrambled LL-37 (Sc-LL-37: RSLEG-TDRFPFVRLKNSRKLEFKDIKIGIKREQFVKIL) were purchased from GeneCust (GeneCust Europe, Dudelange, Luxembourg). Synthesis of truncated forms of LL-37 is detailed elsewhere.³⁰ The individual sequences are LL-31, LLGDF-FRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNL; LL-25, LLGDF-FRKSKEKIGKEFKRIVQRIK; LL-19, LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNL; IG-19, IGKEFKRIVQRIKDFLRNL; RK-19, RKSKEKIGKEFKRIVQRIK; IG-13, IGKEFKRIVQRIK; RK-31, RKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTE; IG-25, IGKEFKRIVQRIKDFLRNLVPRTE; RI-19, RIVQRIKDFLRNLVPRTE; KD-13, KDFLRNLVPRTE. SE-37 (the reverse peptidyl sequence of LL-37, i.e., SETRPVRLNLFDKIR-QVIRKFEKGIKEKSKRFFDGLL) and biotin-LC-LL-37 were from Anaspec (Eurogentec, Angers, France). DF-22 (DFFRK-SKEKIGKEFKRIVQRIK) was synthesized as a peptidyl amide by Fmoc-solid-phase chemistry and purified according to ref 31.

Ethics Statement. The Institutional Review Board of the French Learned Society for Respiratory Medicine (Société de Pneumologie de Langue Française) approved the study, and written informed consent was obtained from the participants to the study (Biocollection DC 2010-1216, CHU Tours). Clinical charts and functional records were collected on a standardized and anonymous collection form. An adult patient suffering from inflammatory pulmonary disease was submitted to a routine bronchoalveolar lavage procedure (Department of Pneumology, CHRU Bretonneau, The University Hospital, Tours, France) with respect to recommendations of the local institutional Ethical Committee, as reported elsewhere.³² CF sputum samples were collected on a routine basis from adult patients followed at the Teaching Hospital of Besançon (CHU Jean Minjoz, France) between 2009 and 2010 as detailed previously.³³

Sputum Samples from CF Patients. Six expectorated sputum samples (three *P. aeruginosa*-positive and three *P. aeruginosa* negative samples named Ps+ and Ps-, respectively) were obtained from CF adult patients and were kindly provided by Dr. G. Couetdic and Dr. P. Plésiat (Laboratoire de Bactériologie, CHU Jean Minjoz, Besançon, France). Samples were considered as “waste”, and subsequently the protocol used for this study did not need a specific agreement from the local research ethics committee. Following the protocol as previously described,³³ each Ps+ and Ps- samples sample was instantly suspended in the conservative buffer A: 100 mM sodium acetate, pH 5.0 containing a serine, aspartate, metallo, and cysteine protease inhibitor cocktail (0.5 mM PMSF, 0.5 mM EDTA, 40 μ M pepstatin A, and 1 mM MMTS) and centrifuged at 5000g at 4 °C for 10 min. The supernatant was frozen and stored at –80 °C until required for analysis. Bicinchoninic acid assays were used to determine the protein concentrations in supernatants (BCA protein assay kit, Interchim, Montluçon, France). To restore the activity of cathepsins, samples were incubated in 100 mM acetate sodium, pH 5.5, DTT 5 mM, Brij35 0.01% (buffer B) for 30 min. The presence of sulfated GAGs in CF sputum (30 μ g total protein) was determined

using 1,9-dimethylmethylene blue (Sigma-Aldrich) staining method and quantified by spectrophotometry at 520 nm.

Western Blot Analysis of LL-37, HBD-2, and SP-A in CF Sputum. The polyclonal anti-LL-37 antibody was purchased from Innovagen (Lund, Sweden) and the polyclonal anti-hBD-2 antibody from Research Diagnostic Inc. (Flanders, New Jersey, USA). The polyclonal anti-SP-A antibody was a kind gift from Dr. Henk Haagsman (Utrecht University, Netherlands). Recombinant hBD-2 was purchased from Research Diagnostic Inc., and purified human SP-A was a kind gift from Dr. Ruud Veldhuizen (University of Western Ontario, Ontario, Canada). Supernatants of CF sputum (standardized amount: 30 μ g protein/sample) were diluted in Laemmli buffer under reducing conditions and boiled for 5 min. Finally, samples were loaded onto 20% polyacrylamide gel for the detection of LL-37 and hBD-2, or on 12% gels for the detection of SP-A, and electrophoretically separated under reducing conditions (Bio-rad System). Prestained molecular mass standards (low molecular range) were obtained from Sigma-Aldrich. For Western blot analysis, gels were electroblotted onto nitrocellulose membranes (Hybond-ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Membranes were incubated under agitation overnight at 4 °C with anti-LL-37 antibody (1:10000 in PBS, 0.1% Tween 20, 5% powdered milk), then incubated with secondary IgG-horseradish peroxidase conjugate (1:5000) for 1 h at room temperature prior to the detection using the ECL Plus Western Blotting Detection system (Amersham Biosciences). A similar protocol was used for the anti-SP-A (1:2500) and anti-hBD-2 antibodies (1:5000). LL-37 (10 ng), SP-A (150 ng), and hBD-2 (10 ng) were used as controls.

Hydrolysis of LL-37 in CF Sputum. Ps+ supernatants were incubated (1–6 h) at 37 °C in 100 mM acetate sodium, pH 5.5, 5 mM DTT, Brij35 0.01% (buffer B) (final volume: 16 μ L; 30 μ g of protein). Reaction mixtures were stopped with Laemmli buffer and boiled for 3 min. Controls were performed in the presence of E-64 (10 μ M). Samples were subjected to SDS-PAGE (20%) under reducing conditions and then immunoblotted as described above using an anti-LL-37 antibody.

Hydrolysis of LL-37 by Human Alveolar Macrophages. Alveolar macrophages were obtained from a bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of a nonsmoking and nonfibrotic patient. BALF was centrifuged at 129g for 5 min, and the cell pellet was resuspended in RPMI 1640 media supplemented with 1% heat-inactivated fetal calf serum and 1% penicillin/streptomycin. Adherent cells were cultured for 24 h at 5% CO₂ and 37 °C. Culture media was replaced and macrophages were grown for additional 24 h without fetal calf serum. Culture media from macrophages were harvested and treated immediately in 100 mM sodium acetate, pH 5.0, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM EDTA, 40 μ M pepstatin A, and 1 mM MMTS (buffer A). The supernatants were centrifuged for 5 min at 9000g at 4 °C to remove floating cells and concentrated by centrifugation with Vivaspin 4 concentrators (Sartorius) at 4000g for 30 min. Alternatively macrophage layers were washed once in ice-cold PBS and scrapped off in the buffer A. Total cell extracts were obtained by a series of three freeze/thaw cycles in liquid nitrogen and a 37 °C water bath. Lysate was centrifuged at 5000g at 4 °C for 10 min. Supernatants were collected, and cell pellets were resuspended in 150 μ L of the conservative buffer A. Measurement of the overall cathepsin activity was performed using Z-FR-AMC (50 μ M) in buffer B at pH 5.5. Total cathepsin activity was determined by titration with E-64. LL-37

(30 ng) was incubated for 0–24 h in the reactive buffer B with supernatants, cytosolic fractions, and cell-free membrane fractions. In parallel, samples were preincubated with E-64 (10 μ M), CA-074 (10 μ M), and Mu-Leu-Hph-VSPH (100 nM) prior to adding LL-37. Samples were subjected to SDS-PAGE (20%) under reducing conditions and then immunoblotted using an anti-LL-37 antibody.

Hydrolysis of LL-37 and LL-37-Derived Peptides by Cathepsins. LL-37, D-LL-37, scrambled LL-37, and SE-37 (89 μ M) were incubated at different incubation times (10–240 min) in the presence or absence of purified CatB, K, L, or S (5–89 nM) in 100 mM sodium acetate buffer pH 5.5, containing 2 mM DTT and 0.01% Brij35 (buffer C) at 37 °C. Similar experiments were performed with the human S2 subsite CatL variant (Leu67Tyr/Ala205Leu) and the human S2 subsite CatK variant (Tyr67Leu/Leu205Ala). LL-37 (89 μ M) was incubated with CatK and S (5 nM) in the presence or absence of chondroitin 4-sulfate (C4-S), heparan sulfate (HS), hyaluronic acid (HA), and heparin (HP) (0.0015–0.15%) in the reactive buffer (pH 5.5). Control experiments were performed in the presence of E-64 (10 μ M). Alternatively hydrolysis of LL-37 was performed in the presence of CatS in 100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, containing 2 mM DTT and 0.01% Brij35. Hydrolysis of LL-37 by HNE was performed in 50 mM HEPES buffer, pH 7.4, 0.05% NP40, 150 mM NaCl. Inhibition control of HNE was performed with 10 μ M Pefabloc. Reaction mixtures were boiled in Laemmli buffer for 3 min and loaded onto 8–25% precast gradient gels (Pharmacia, Phastgel, GE Healthcare Europe, Paris, France). Gels were stained with Coomassie Brilliant Blue G-250. The ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA) was used for densitometric analysis of LL-37 peptide band.

Identification of LL-37 Cleavage Sites. Each cathepsin (20 nM, final concentration) was incubated with LL-37 (89 μ M) at different times (30–240 min) in 100 mM sodium acetate buffer pH 5.5, containing 2 mM DTT and 0.01% Brij35 (buffer C) at 37 °C. The same experiments were carried out with D-LL-37, sc-LL-37, SE-37, LL-25, LL-19, LL-13, RK-25, IG-19, RK-19, IG-13, RK-31, IG-25, RI-19, and KD-13 (89 μ M final). The reaction was stopped by adding ethanol (1:5, v/v) (Carlo Erba Reagents, Val de reuil, France). After centrifugation at 3200g for 30 min at 4 °C, the precipitate was removed, and the supernatant containing the native peptide and/or its proteolytic fragments was evaporated to dryness and redissolved in 0.1% trifluoroacetic acid. An aliquot of each sample was analyzed by reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) with a C-18 column (RP-18, LichroCART, Purospher, Merck, France) using a linear 0–90% water/acetonitrile gradient in the presence of 0.1% TFA, at a flow rate of 0.5 mL/min. Chromatograms were treated with ChromQuest software (SpectraSystem). Fragments were collected and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry using a MALDI-TOF-TOF Ultraflex (Bruker Daltonics). Calibration was performed with peptides of known molecular mass (1–2.5 kDa range). The accuracy of mass determinations was $\pm$ 0.02%. The identification of LL-37 cleavage sites was determined with the FindPept Tool accessible to SIB Bioinformatics Resource Portal (http://web.expasy.org/cgi-bin/findpept/findpept_form.pl).

Antimicrobial Activity. LL-37 (200 μ M) was incubated in the presence or absence of each cathepsin (11–44 nM) in buffer C for 1–6 h at 37 °C. Control experiments were conducted with heat-inactivated cathepsins. After incubation, an

aliquot was taken from each sample and diluted 1:2, 1:5, 1:10, and 1:20 in the reactive buffer. Samples were then precipitated with absolute ethanol and centrifuged at 3200g for 30 min at 20 °C. Supernatant containing LL-37 and/or its proteolytic fragments were evaporated, and the dried pellets were resuspended in 10 μ L of sterilized ultrapure water. Antimicrobial activity of each sample was then evaluated by radial diffusion assay technique (RDA) as previously described.³⁴ Briefly, bacterial strains *E. coli* JS (ATCC 43745), *P. aeruginosa* (ATCC 25010), and *S. aureus* (ATCC 29740) were grown overnight in 2 mL of fresh TSB at 37 °C under gentle agitation. Absorbance of culture was then measured at 620 nm. On the basis of the relationship $\text{Abs}_{620} \times 10^8 = 2.5 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$ ³⁴ culture was diluted to obtain a bacterial concentration of $5 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$ in 50 mL of fresh TSB and then incubated for an additional 2.5 h at 37 °C under gentle agitation to obtain a mid logarithmic phase organism. Bacteria were then centrifuged at 900g for 10 min at 4 °C and washed once with cold 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 and resuspended in 10 mL of the same buffer. Bacterial strains ($4 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$) were added to 10 mL of previously autoclaved warm poor tryptone soy agar (TSA) (tryptone soy powder: 0.03%, LE agarose: 0.8%) maintained in liquid phase. Poor TSA containing bacteria was then poured in an 85 mm diameter Petri dish (Corning, New York, USA) to form a uniform layer. A 2.5 mm diameter gel punch was used to make wells. After 6 μ L was added to each sample per well, plates were incubated at 37 °C for 3 h to allow radial diffusion and then overlaid with 10 mL of rich TSA (TS powder: 12%, LE agarose: 1%). After an overnight incubation, the diameter of bacterial growth inhibition (expressed in mm) was measured and subtracted from the diameter of the well. Antimicrobial activity of synthetic DF-22 and RK-19 was assessed following the same protocol. Minimal inhibitory concentration (MIC) of LL-37 was determined by plotting the diameter of bacterial growth inhibition against the log of peptide concentration (20–400 μ M). The intersection of the slope with the x-axis represents the lowest concentration of peptide that totally inhibits visible bacterial growth. The same experiments were carried out with DF-22 and RK-19. Assays were performed in triplicate and repeated twice.

Bactericidal Activity. Bactericidal activity of LL-37, DF-22, and RK-19 was assessed using Live/Dead BacLight bacterial viability Kit (Molecular Probes, Invitrogen Life Technologies SAS, Saint Aubin, France) as previously described.²⁴ Briefly, each peptide (concentration = $1 \times \text{MIC}$) was added to log-phase *P. aeruginosa* ($2 \times 10^8 \text{ CFU/mL}$) or *S. aureus* ($2 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$), and samples were incubated for 3 h at room temperature. Fluorescence of both membrane-permeable SYTO 9 fluorophore that labels live bacteria and membrane-impermeable propidium iodide was measured following manufacturer's instructions. The experiments were performed in triplicate, and viability data were averaged.

CD Spectroscopy. CD spectra of LL-37, DF-22, and RK-19 were obtained using a Jasco J-810 spectropolarimeter (Jasco France, Bouguenais, France) equipped with a Peltier thermostat system. The path length of the cell was 1 mm (Hellma, VWR). Peptide concentration was 20 μ M. Data acquisitions were made at 0.1 nm intervals with a dwell time of 1 s between 200 and 260 nm, at 37 °C in 100 mM sodium phosphate buffer pH 5.5 and pH 7.4, and averaged from three repeated scans. Similar assays were performed in aqueous solution. Secondary structure content was assessed by deconvolution of the CD spectra using spectra manager software (Jasco). Prediction of secondary

structure and determination of helicity were performed using the Agadir program (<http://agadir.crg.es>). Calculated mean hydrophobicity was based on the hydrophobicity scales for amino acids.³⁵

Inhibition of CatL by LL-37. CatL (2 nM) was incubated with LL-37 (0–900 nM) in 96-well microtitration plates (Nunc microtiter plates, ThermoFisher Scientific, France) in 100 mM sodium acetate buffer pH 5.5, containing 2 mM DTT and 0.01% Brij35 (buffer C) at room temperature. After addition of Z-Phe-Arg-AMC (2.5 to 20 μ M), the residual peptidase activity was followed at 37 °C by monitoring the fluorescence release (Spectramax Gemini spectrofluorimeter, Molecular Devices, Bioproducts) (wavelengths of 350 nm for excitation and of 460 nm for emission). Similar assays were performed with CatB, K, and S. In addition, experiments were performed with D-LL-37, sc-LL-37, SE-37, LL-25, LL-19, LL-13, RK-25, IG-19, RK-19, IG-13, RK-31, IG-25, RI-19, and KD-13 (900 nM). The type of inhibition and K_i values were determined using Lineweaver–Burk plots ($1/S = f(1/v)$) and Dixon plots ($1/v = f([I])$), respectively. Furthermore, CatL peptidase activity was monitored at 37 °C in the presence of LL-37 (900 nM) using buffer C supplemented with increasing concentration of NaCl (0 to 1 M). The ability of LL-37 to interact with the S2 CatL and S2 CatK variants was measured using Z-Phe-Arg-AMC as substrate. Assays were performed at least in three individual experiments in triplicate, and all data were treated with SoftMax Pro software (Molecular Devices). The values represent means $\pm$ SD.

Computational Analysis. The following PDB structures were used: CatK (PDB ID: 3KWZ, 1.49 Å), CatL (PDB ID: 2XU4, 1.12 Å), proCatK (PDB ID: 1BY8, 2.60 Å), and LL37 (PDB ID: 2K6O, NMR). Docking of LL-37 to CatK and L was carried out with ClusPro 2.0.³⁶ MD simulations were carried out using AMBER 11.³⁷ Docked complexes were simulated in a TIP3P water truncated octahedron periodic box with the minimal distance of 8 Å from the solute atoms to the box boundary and neutralized by counterions. Molecular dynamics (MD) simulations were preceded by two energy-minimization steps: 500 cycles of steepest descent and 1000 cycles of conjugate gradient with 10 kcal/mol Å harmonic restraints on protein atoms; 3000 cycles of steepest descent and 3000 cycles of conjugate gradient without constraints; 10 ps of heating of the system from 0 to 300 K; 100 ps of MD equilibration at 300 K and 10^6 Pa in isothermal isobaric ensemble (NPT). Ten ns of MD were carried out in periodic boundary conditions in NPT ensemble with Langevin temperature coupling with collision frequency parameter $\gamma = 1 \text{ ps}^{-1}$ and Berendsen pressure coupling with a time constant of 1.0 ps. The SHAKE algorithm, a 2 fs time integration step, an 8 Å cutoff for nonbonded interactions and the Particle Mesh Ewald method were used. ff99SB force field parameters were used. Postprocessing energetic analysis was carried out in a continuous solvent model using molecular mechanics-generalized Born surface area (MM-GBSA) with $\text{igb} = 2$ for each 50th frame (100 frames in total). In order to calculate individual impacts of LL-37 residues to the binding of CatL in the analyzed docking poses, MM-GBSA calculations of per residue free energy decomposition were carried out using default parameters. To obtain estimates for the binding energy of LL-37 truncated peptides in both poses, the energy values obtained for each amino acid value of the truncated peptides were summed up. This approach should be cautiously interpreted as it is based on the assumption that truncated mutants specifically interact in a similar manner as to

the corresponding parts of the full LL-37 peptide. Statistical analysis of modeling data was carried out with the R package.³⁸

Statistical Analysis. Statistical significance was assessed using the nonparametric two-way Mann–Whitney U test. A *p*-value of less than 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Detection of LL-37 in Human CF Sputum. Immunoreactive LL-37 (4.5 kDa) was present in both *P. aeruginosa* positive (Ps+) and negative (Ps-) CF expectorations samples (Figure 1A). According to densitometric analysis, the estimated

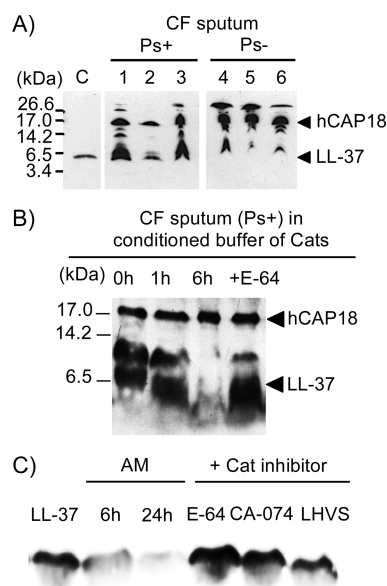


Figure 1. Degradation of LL-37 by human cathepsins in CF sputum supernatants and alveolar macrophages. (A) Status of LL-37 in cell-free supernatants of *P. aeruginosa*-positive (Ps+, samples: 1–3) and negative (Ps-, samples: 4–6) CF sputum. Supernatants (standardized amount: 30 μ g protein/sample) were analyzed by Western blotting using a polyclonal anti-LL-37 antibody. Purified LL-37 was used as control (c). (B) Cleavage of endogenous LL-37 by CF sputum after incubation (0–6 h) in 100 mM acetate sodium, pH 5.5 containing 5 mM DTT and 0.01% Brij35 (buffer B) (a representative of the six samples is shown). Alternatively, supernatants were preincubated with E-64 (6 h). (C) Western blot of LL-37 degradation by human alveolar macrophages (AM). LL-37 (30 ng) was incubated for 0–24 h with AM in buffer B. In parallel, samples were incubated with E-64, CA-074, and Mu-Leu-Hph-VSP prior to adding LL-37. Samples from CF sputum and alveolar macrophages were harvested in 100 mM sodium acetate, pH 5.0 (buffer A), containing a serine, aspartate, metallo, and cysteine peptidase inhibitor cocktail (0.5 mM PMSF, 0.5 mM EDTA, 40 μ M pepstatin A, and 1 mM MMTS).

concentrations of LL-37 in CF samples ranged from 2 to 6 μ g/mL. Its precursor hCAP18 (18 kDa) and immunoreactive forms of LL-37 with an apparent higher molecular weight, which may correspond to oligomeric forms, were also detected. A prolonged incubation time of CF samples (6 h) in the reaction buffer of cysteine cathepsins led to the complete degradation of LL-37 but not hCAP18 (Figure 1B). The hydrolysis was blocked by the broad-spectrum cathepsin inhibitor, E-64. Our previous work reported that elevated levels of active CatB and CatL were found in CF sputum in comparison to CatK and CatS, and that their concentrations did not depend on the degree of *P. aeruginosa* colonization.³³ Since alveolar macrophages in CF sputum are the major source

of cathepsins, we evaluated their ability to degrade LL-37. Cell-free lysate from non-CF human alveolar macrophages readily degraded LL-37 after 24 h incubation, and the hydrolysis was impaired in the presence of E-64, CA-074 (a selective CatB inhibitor), and LHSV (a potent CatS inhibitor) (Figure 1C). Pro- and mature forms of CatB, K, L, and S were immunodetected in the lysate fraction (data not shown), and the active site concentrations of the cathepsins were determined by E-64 titration and estimated at 4.8 μ M. In contrast, we did not detect significant hydrolysis of LL-37 upon incubation with the conditioned medium from the culture of macrophages buffered at pH 5.5, which contained lower concentrations of endopeptidase cysteine cathepsins (~200 nM). As previously reported,³⁹ the stability of LL-37 in CF sputum is likely due to the presence of anionic molecules including GAGs that interact with LL-37 and protect it from proteolysis. Taking these data into account, we investigated the individual contribution of CatB, K, L, and S to hydrolyze and inactivate LL-37 *in vitro* and the protective effects of GAGs.

CatK and CatS Degrade and Inactivate LL-37. LL-37 was incubated with increasing concentrations of purified CatB, L, K, and S (substrate/enzyme molar ratios = 1000 to 17600; as found in CF BALFs^{11,39}) at pH 5.5 for 1 h at 37 $^{\circ}$ C, prior analysis of the degradation pattern of LL-37 by SDS-PAGE. CatS, CatK, and to a lesser extent CatB degraded LL-37 in a dose-dependent manner and generated truncated peptides with an apparent mass of ~2.3–2.8 kDa (Figure 2A). Release of smaller fragments was observed after prolonged incubation. Conversely, under similar conditions CatL did not cleave LL-37. Moreover, CatS, which is more efficient than CatK to cleave LL-37 at pH 5.5 (Figure 2B), hydrolyzed LL-37 at pH 7.4 (Figure 2C) and was more efficient than human neutrophil elastase (HNE) that is known to inactivate LL-37.⁴⁰ On the basis of findings that glycosaminoglycans (GAGs) inhibit LL-37 proteolysis,³⁹ LL-37 was incubated with chondroitin 4-sulfate (C4-S), heparin (HP), heparan sulfate (HS), and hyaluronic acid (HA) prior to adding CatK and CatS, respectively (Figure 2D,E). HP, HS, and C4-S, but not HA, inhibited in a dose-dependent manner the degradation of LL-37 by both proteases. To a lesser extent for HP, addition of NaCl restored the hydrolysis of LL-37 by both proteases in a dose-dependent manner (Figure 2F,G). In addition, digestion experiments of LL-37 with CatK and CatS were not impaired in the presence of 0.15 M NaCl. At neutral pH, LL-37 has a positive net charge of +6 (Table 1). The peptide carries 11 positive charges (6 lysine and 5 arginine residues) and 5 negative charges (3 glutamate and 2 aspartate residues). These results suggest that interactions between the negatively charged sulfated GAGs and LL-37 are mostly governed by electrostatic forces, which shield LL-37 from cathepsin-mediated degradation.

Next, cleavage products generated by CatB, K, L, and S were separated by RP-HPLC (Figure 3) and identified by MALDI-TOF mass spectrometry (Table 1). Three major hydrolysis products corresponding to cleavage sites Gln22-Arg23, Lys25-Asp26, and Arg29-Asn30 were detected after 30 min incubation with CatK (peaks 1, 6, and 7) (Figure 3A) and labeled as DF-19, DF-22, and NL-8 peptides, respectively. Prolonged incubation (4 h) led to the hydrolysis of both DF-19 and DF-22 peptides. Two additional LL-37 products were also detected and named RI-7 and KS-15. With the exception of an additional cleavage site (Arg7-Lys8), CatS showed the same cleavage specificity as CatK (Figure 3B). Compared to CatS and CatK, LL-37 was less sensitive to degradation by CatB

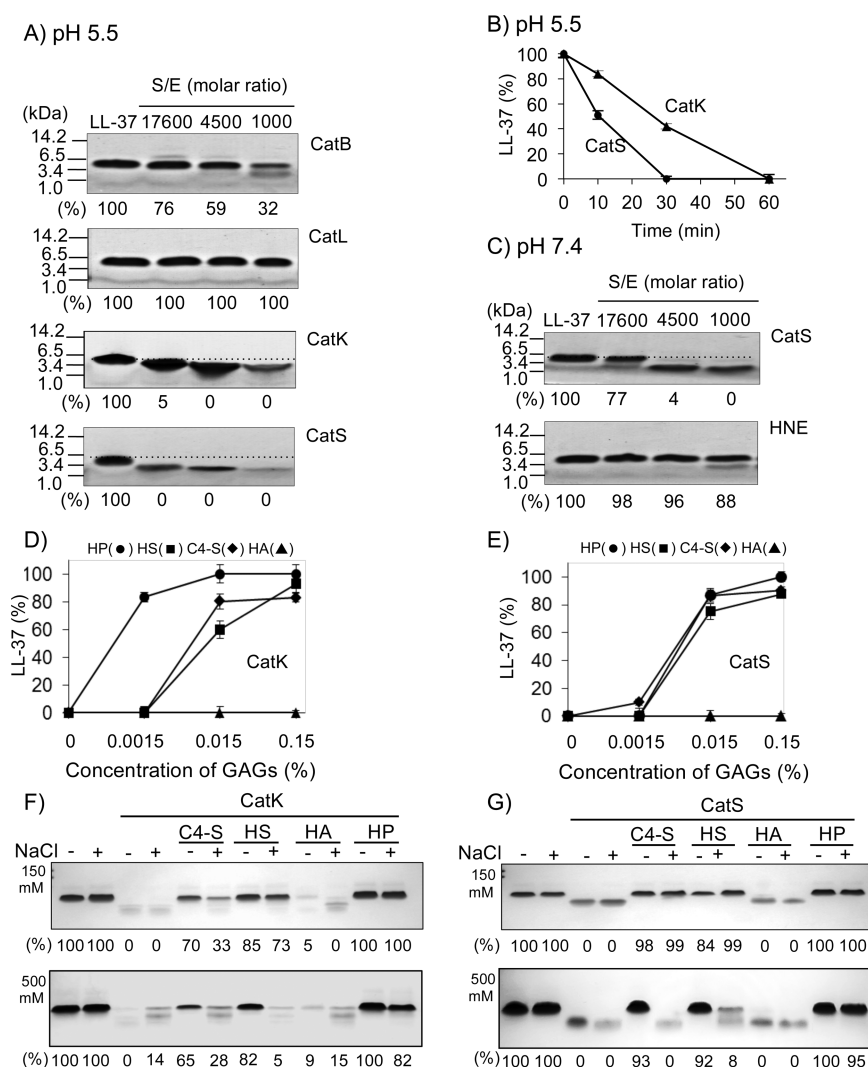


Figure 2. Hydrolysis of LL-37 by CatS and K and its protection by GAGs. (A) LL-37 (89 μ M) was incubated in the presence or absence of CatB, K, L, and S (5 to 89 nM) in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, 2 mM DTT and 0.01% Brij35 for 1 h at 37 $^{\circ}$ C (buffer C). Incubation was made with three different S:E molar ratios. (B) Time dependence of LL-37 hydrolysis by CatS and CatK (S:E = 17,600). (C) LL-37 was incubated with CatS and HNE in their respective buffer (pH 7.4) for 1 h at 37 $^{\circ}$ C. Dashed line indicates the position of native LL-37. (D and E) Protection of LL-37 with glycosaminoglycans. LL-37 was incubated with CatK (D) and CatS (E) (S:E = 17 600) in the presence of increasing concentrations of heparin (HP), heparan sulfate (HS), chondroitin 4-sulfate (C4-S), and hyaluronic acid (HA) at pH 5.5 for 1 h. (F and G) The same experiment was performed in the presence of NaCl (150 and 500 mM). Samples were separated on a 8–25% SDS-PAGE under reducing conditions and gels were Coomassie stained with Brilliant Blue G-250. The density of the remaining native LL-37 band was measured with ImageJ software (NIH software) and expressed as % of total LL-37 used (panels A, C, F, and G). Each experiment was performed at least two times.

(Figure 3C). We identified two cleavages occurring at the Arg19-Ile20 and Thr35-Glu36 bonds (Table 1). In contrast, CatL did not generate hydrolysis products (Figure 2A) and only after extended incubation times (4 h) a minor product was detected (peak 1, Figure 3D) corresponding to the DF-34 peptide. Cleavage occurred at the N-terminus at the Gly3-Asp4 bond (Table 1). As expected, the D-enantiomer of LL-37 (D-LL-37, i.e., each L-residue was replaced by a D-amino acid) was resistant to proteolysis by cathepsins under the same experimental conditions (data not shown).

Given the critical role of the midregion of LL-37 for the antimicrobial activity,⁴¹ cleavage within this region would impair its biological activity. Therefore, Gram-negative (*P. aeruginosa* and *E. coli*) and Gram-positive bacteria (*S. aureus*) were tested for their antimicrobial susceptibility with increasing concentrations of LL-37 products. Radial diffusion assays indicated that both CatS and K, but not CatB and L,

inactivated the antibacterial activity of LL-37 (S:E molar ratio = 4500) (Figure 4). However, when LL-37 was incubated with a high concentration of CatB (200 nM, i.e., molar ratio S:E = 1000) the antimicrobial activity of LL-37 products was partially impaired (data not shown). Conversely, when assays were performed with low concentration of CatS and CatK (10 nM, i.e., molar ratio S:E = 17 600), the antimicrobial activity of LL-37 products against Gram-negative bacteria was similar to that of the control LL-37 (data not shown). A moderate antimicrobial effect was observed against *S. aureus*. According to RP-HPLC analysis, LL-37 was completely degraded in the reaction mixtures, suggesting that among LL-37 products one has antimicrobial significance. To support this assumption, we focused on the DF-22 peptide for the following reasons: (i) DF-22 was generated by both CatS and CatK, (ii) it overlaps the central region of LL-37, and (iii) DF-22 was completely degraded after 4 h incubation with both enzymes (S:E molar

Table 1. Hydrolysis of LL-37 by Cats K, S, B, and L: Identification of the Cleavage Sites and Analysis of the LL-37 Products

Abbrevia- tion	Mass ^a (Da)	Peak	Sequence	pI ^b	Net charge	GRAVY ^c	Agadir ^c
			K/S S K/S K/S K/S K/S K/S 1 10 20 30 37 ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES ↑ ↑ ↑ ↑ L B B				
LL-37	4493.6	-		10.6	+6	-0.724	5.10
CatK							
NL-8	915.5	1	NLVPRTES	6	+1	-0.825	0.00
KE-8	1047.6	2	KEFKRIVQ	10	+2	-0.975	0.04
DF-9	1118.7	3	DFFRKSKEK	9.7	+2	-2.044	0.07
KE-11	1444.8	4	KEFKRIVQRIK	11.1	+4	-1.064	0.19
DF-11	1354.7	5	DFFRKSKEKIG	9.7	+2	-1.300	0.14
DF-19	2383.3	6	DFFRKSKEKIGKEFKRIVQ	10.2	+4	-1.163	0.36
DF-22	2780.3	7	DFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIK	10.6	+6	-1.182	0.74
CatS							
NL-8	915.5	1	NLVPRTES	6	+1	-0.825	0.00
KE-8	1047.6	2	KEFKRIVQ	10	+2	-0.975	0.04
DF-9	1118.7	3	DFFRKSKEK	9.7	+2	-2.044	0.07
RI-7	947.6	4	RIKDFLR	10.8	+2	-0.757	0.01
KE-11	1444.8	5	KEFKRIVQRIK	11.1	+4	-1.064	0.19
KS-15	1818.1	6	KSKEKIGKEFKRIVQ	10.2	+4	-1.313	0.25
DF-19	2383.3	7	DFFRKSKEKIGKEFKRIVQ	10.2	+4	-1.163	0.36
DF-22	2780.3	8	DFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIK	10.6	+6	-1.182	0.74
CatB							
LL-19	2326.3	1	LLGDFFRKSKEKIGKEFKR	10.2	+4	-1.058	0.92
IV-16	1968.3	2	IVQRIKDFLRNLPRT	11.7	+4	-0.150	1.46
CatL							
DF-34	4207.7	1	DFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	10.6	+6	-1.000	5.22

^aMass was determined by MALDI-TOF analysis. ^bpI was calculated with protparam (expasy.org/protparam). ^cPredictive algorithm (<http://agadir.crg.es>).

ratio = 4500). The peptide DF-22 was synthesized and tested for its antimicrobial activity (Table 2). Notably, the antimicrobial potency of DF-22 (MIC) was comparable to that of the full-length LL-37 ranging from 2 to 9 μ M. This result was similar to a related LL-37 derived peptide, RK-19, which was reported to exhibit antimicrobial activity against *E. coli* and *S. aureus*.⁴² Thus, deletion of the three N-terminal residues of DF-22, which yields RK-19, did not play a pivotal role in the antimicrobial activity against the bacterial strains tested. Moreover, a viability assay (Live/dead BacLight bacterial viability Kit) was performed with LL-37, DF-22, and RK-19. Nearly 50% of *P. aeruginosa* lost its viability following exposure to DF-22 or RK-19 with concentration of 1x the MIC for 3 h, whereas only 10% of *S. aureus* was killed following the same exposure with DF-22 and RK-19. In contrast, LL-37 killed 50% of both strains. Physicochemical properties of DF-22 (net charge, isoelectric point, and hydrophobicity) compared to those of LL-37 (Table 1). Moreover, analysis of the helical wheel representation indicated that hydrophobic residues of DF-22 converged to one side and the hydrophilic residues to the other side of the helical axis as reported for LL-37 (Figure 5A). Conversely, we noted an important difference of the agadir score (helical content) between DF-22 (0.74) and LL-37 (5.1). Removal of 3 and 12 amino-acids from the N- and C-terminal domain, respectively, strongly decreased the propensity of LL-37 to form an α -helix. Accordingly, we did not observe an α -helical structure by CD spectra for DF-22 contrary to LL-37 (33% of α -helical content at pH 7.4 and 22% at pH 5.5) (Figure 5B). The low propensity of LL-37 to adopt an α -helical structure in phosphate buffer was reported previously.⁴³ CD spectra of RK-19 at both pH were comparable to that of LL-37 in water.⁴⁴ These results suggest that the antimicrobial activity of LL-37 does not primarily depend on the presence of an α -helix in solution.

Inhibition of CatL by LL-37. Recently, Pazgier et al. (2013)¹⁷ reported that both LL-37 and hCAP18 caused an apparent inhibition of CatL activity at high concentrations (>1 μ M). They suggested that the region involved in the inhibition is located within LL-37 and not in the N-terminal prodomain of hCAP18 (CLD), as proposed in a previous report.¹³ To clarify this contradiction, we investigated in detail the mode of inhibition of CatL by LL-37. The Lineweaver–Burk double-reciprocal plots indicated that the inhibition of CatL is competitive and reversible, and Dixon plot analysis resulted in a K_i value of 150 nM (Figure 6A,B). Furthermore, the inhibition was stable within prolonged incubation times of 4 h. In contrast, both D-LL-37 enantiomer and scrambled Sc-LL-37 (same charge and net amino acid composition as native LL-37, without helical organization) did not inhibit CatL. While addition of NaCl restored the peptidase activity of CatL toward Z-Phe-Arg-AMC in a dose-dependent manner (Figure 6C), LL-37 still inhibited significantly CatL at physiologically relevant ionic strengths (0.1–0.5 M NaCl; $p < 0.05$). A K_i of 500 nM was determined in the presence of 0.15 M NaCl. Moreover, no hydrolysis of LL-37 was detected by SDS-PAGE analysis in the presence of CatL with increasing concentrations of NaCl (0.1–0.5 M, data not shown). This implies that electrostatic interactions are important for the binding of the positively charged LL-37 (pI = 10.6) to the negatively charged CatL (theoretical pI = 4.7) at pH 5.5. Preincubation of LL-37 with 15 to 150 μ g/mL of C4-S, HP, or HS prevented the inhibition of CatL, while HA had no influence on the inhibition (data not shown).

On the other hand, no inhibition of CatK, S, and B was observed in the presence of LL-37, suggesting that critical residues located within the active site of CatL interact with LL-37. It is well established that the primary specificity site of cathepsins depends on S2–P2 interactions.⁴⁵ Comparison of the structures of CatL and CatK showed sequence differences

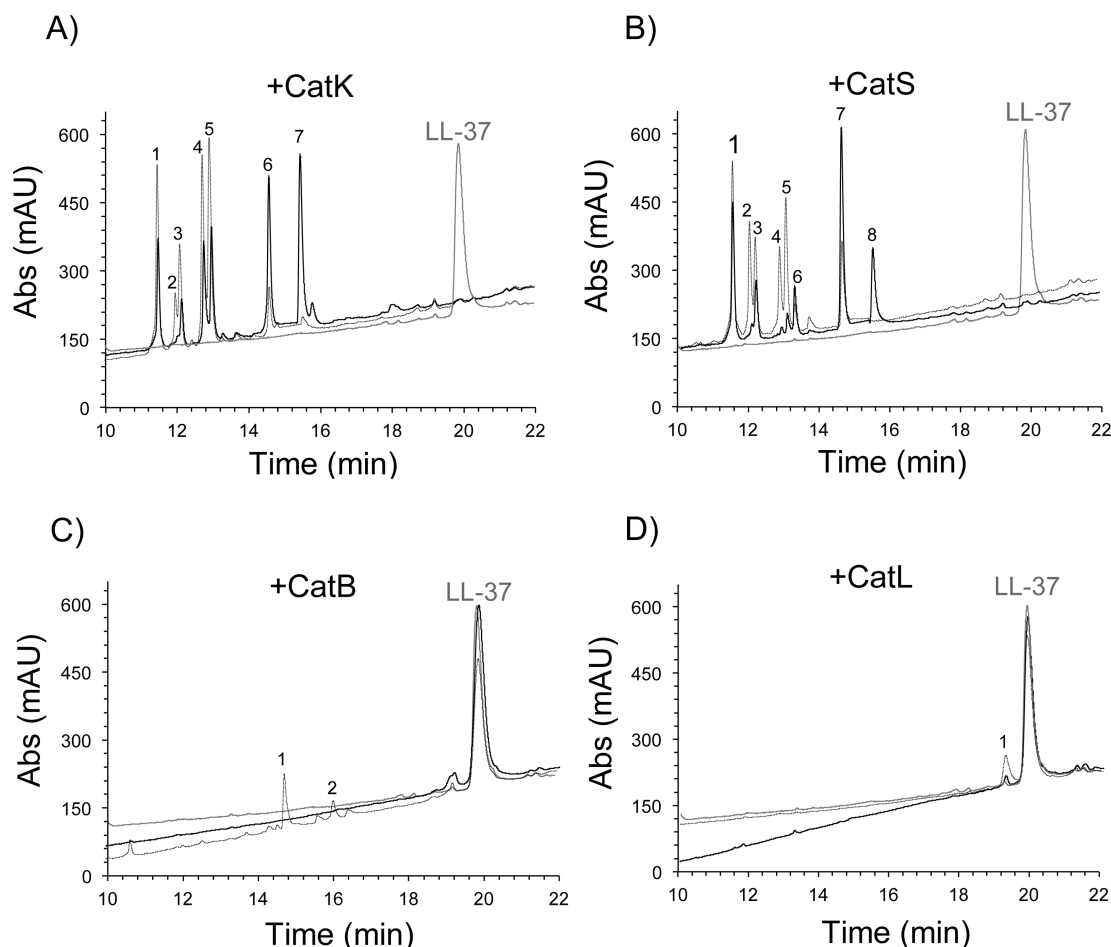


Figure 3. Analysis of LL-37 degradation products. LL-37 (89 μ M) was incubated in the presence of CatK (panel A), CatS (panel B), CatB (panel C), and CatL (panel D) (S:E molar ratio = 4500) in buffer C for 30 min (full line) and 240 min (dotted line) at 37 °C. Control experiments used untreated LL-37 (light gray). Hydrolysis products were analyzed by RP-HPLC (C-18 column) as described in the Experimental Procedures. Chromatograms were recorded at 220 nm.

at residues 67 and 205 (papain numbering) in the S2 binding pocket, which form part of the wall and the bottom of this subsite, respectively.⁴⁶ The exchange of residues 67 and 205 of the S2 pocket of CatL (Leu67Tyr/Ala205Leu) by those present in CatK resulted in the complete hydrolysis of LL-37, as observed with the wild-type (wt) CatK (Figure 6D). Conversely, LL-37 hydrolysis was significantly decreased upon incubation with the S2 CatL-like CatK mutant (Tyr67Leu/Leu205Ala) (80% of remaining LL-37) compared to the complete degradation by wt CatK under the same conditions. Nevertheless, inhibition of the CatK variant presented a $\sim$ 52-fold difference in K_i value ($K_i = 7.8 \mu$ M) to that of wt CatL. These data indicate that the switch of the S2 subsite of CatK into a S2 CatL-like one was insufficient to fully mimic the inhibition of wt CatL by LL-37.

Subsequently, a library of synthetic truncated fragments obtained by sequential deletion of the N-terminus or C-terminus or from both ends of the full-length LL-37 was used to investigate their potentials to inhibit CatL as well as to identify the critical region interacting with the enzyme (Table 3). As the deletions progressed from the C-terminal end (LL-31, LL-25, LL-19, and LL-13), CatL activity was restored gradually. The removal of the first six amino acids from the N-terminal domain (RK-31) induced a $\sim$ 2-fold loss of the inhibition compared to LL-37, while the removal of the next

following N-terminal amino acids (IG-25, RI-19, and KD-13) completely abolished the inhibitory activity of LL-37. Deletion of six amino acids from both ends of native LL-37 (RK-25) resulted in a peptide which allowed about 80% of the CatL activity. Peptides containing the truncated central domain of LL-37 (IG-19, RK-19, IG-13) did not inhibit CatL. In addition, LL-37-truncated peptides were analyzed by RP-HPLC to evaluate their proteolytic resistance to CatL. After 1 h incubation period, peptides RK-25, RK-19, IG-25, IG-19, IG-13, RI-19, and KD-13 were almost completely degraded by CatL, whereas significant amounts (30–50%) of native peptides LL-31, LL-25, LL-19, LL-13, and RK-31 remained intact. With the exception of LL-37, LL-31, LL-25, LL-19, and LL-13 no significant correlation was measured between the inhibition of CatL and predicted α -helical content of truncated peptides (Table 3). These results indicated that the whole sequence of LL-37 is necessary for the inhibition of CatL.

Molecular Modeling of the Interactions between LL-37 and CatL. To provide insight into the mechanism of inhibition, molecular modeling studies were carried out to examine potential interaction sites of LL-37 with CatL. To achieve this, LL-37 was docked to the whole surface of CatL. Two clusters of docking solutions were obtained and featured LL-37 covering the active site of the enzyme in two different orientations (Figure 7A), which were referred to as forward

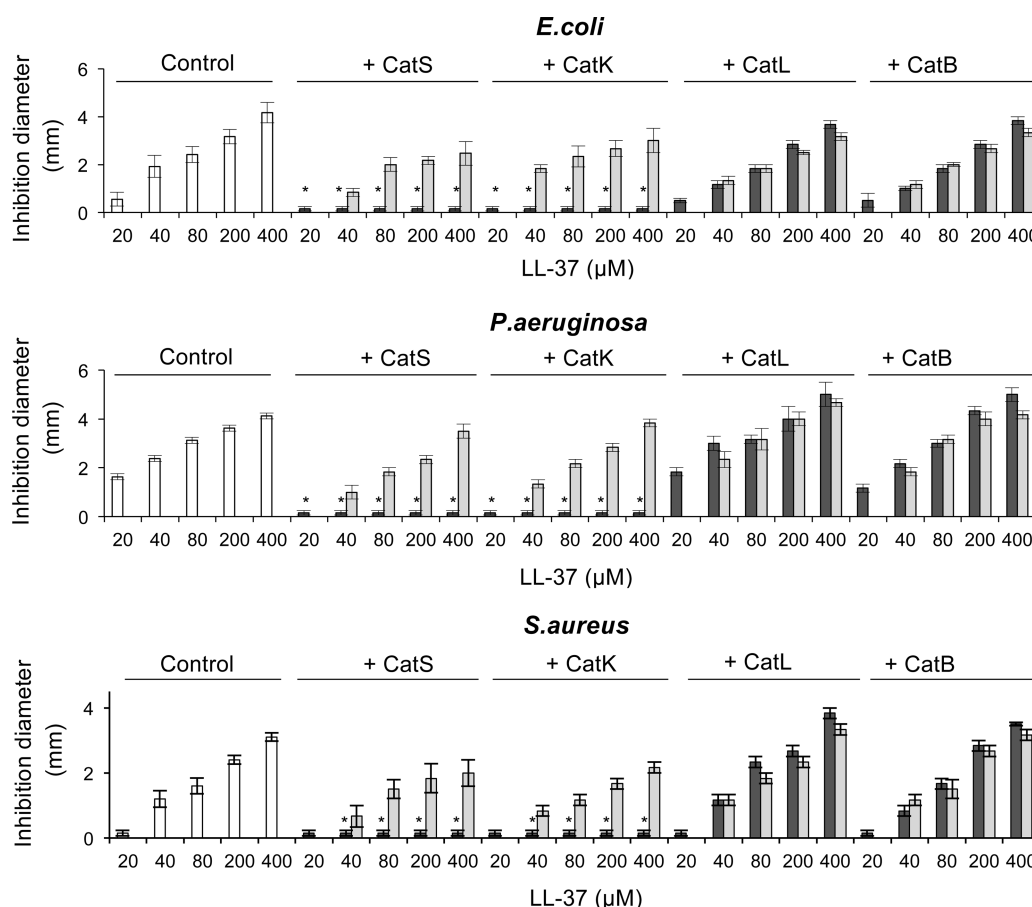


Figure 4. Inactivation of the antimicrobial activity of LL-37 by CatS and K. LL-37 (200 μM) was incubated either alone (white bar) or with Cats B, K, L, or S (44 nM) (dark gray) in buffer C for 6 h at 37 $^{\circ}\text{C}$. Heat-inactivated enzymes were used as controls (light gray). After incubation, aliquots were taken from the reaction mixture and diluted 1:20, 1:10, 1:5, and 1:2. Samples were then precipitated to remove the enzyme and concentrated twice. Evaluation of antimicrobial activity against *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *S. aureus* was assessed by radial diffusion assay method. Inhibition diameter of bacterial growth was measured and expressed in mm. Data are represented as mean $\pm$ SEM ($n = 3$). Statistical analysis was performed with the two way Mann–Whitney U test, and values were compared with the control (*: $p < 0.02$).

Table 2. Bacterial Minimal Inhibitory Concentration (MIC) of LL-37 and Synthetic Derived Fragments^a

peptide	MIC (μM)		
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
LL-37	2.7 ± 0.1	8.9 ± 2.7	7.6 ± 2.6
DF-22	2.2 ± 0.3	2.5 ± 0.2	3.3 ± 1.2
RK-19	2.4 ± 1.0	4.7 ± 1.0	3.2 ± 1.3

^aMIC was assessed by radial diffusion assay. Results are expressed as mean $\pm$ SD ($n = 3$).

(i.e., the peptide is oriented in the way that it could be cleaved by the protease) and reverse orientations (the peptide is in the opposite orientation). The representative solutions from these two clusters were then simulated with molecular dynamics (MD), and free energies of binding were calculated (Table 4). MM-GBSA free energy calculations showed the crucial role of electrostatics for CatL/LL-37 interaction independently of the LL-37 orientation in the binding cleft. The catalytic domain of CatL, which is substantially more negatively charged than in other related cathepsins, favored interactions with positively charged LL-37. Although the total binding energy for LL-37 and CatK ($\Delta G_{\text{total}} = -80.3 \pm 10$ kcal/mol) was similar to that of CatL/LL-37, the electrostatic energy component for CatK ($\Delta G_{\text{elect}} = -221.6 \pm 59$ kcal/mol) was significantly less

favorable (~ 7 -fold) as that of CatL. Predicted total binding energies for LL-37 and CatL were similar for both orientations suggesting that the reverse orientation is potentially accessible to the active site of CatL. To confirm this result, we tested *in vitro* a synthetic peptide (SE-37) corresponding to the reverse sequence of LL-37. Interestingly, SE-37, which adopts an α -helical structure at pH 7.4 but not at pH 5.5 (Figure 5B) inhibited CatL in the same range as LL-37 ($K_i = 100$ nM). Moreover, RP-HPLC analysis revealed no significant hydrolysis of SE-37 upon 30 min incubation with CatL, in contrast to that observed with CatB, K, and S. Next, the relative individual energy contributions of LL-37 residues to the binding with CatL were evaluated for LL-37 in both forward and reverse orientations (Figure 7B). Seventeen residues favored binding to CatL in both positions, while five negatively charged residues (Asp4, Glu11, Glu16, Asp26, and Glu36) as well as Gln22 and Ser37 had unfavorable contributions. It has to be noted that ΔG binding energies for Ile13, Lys15, Phe17, Lys18, Arg19, Ile20, and Val21 in the direct orientation were comparable to the data for the reverse orientation. Moreover, these residues covered the unprimed subsites (S1–S3) of CatL in both orientations. Noteworthy, analysis of binding free energy of native and LL-37 truncated peptides pointed out that there is a significant relationship between the binding energy and the apparent inhibition of CatL when the position of peptides are

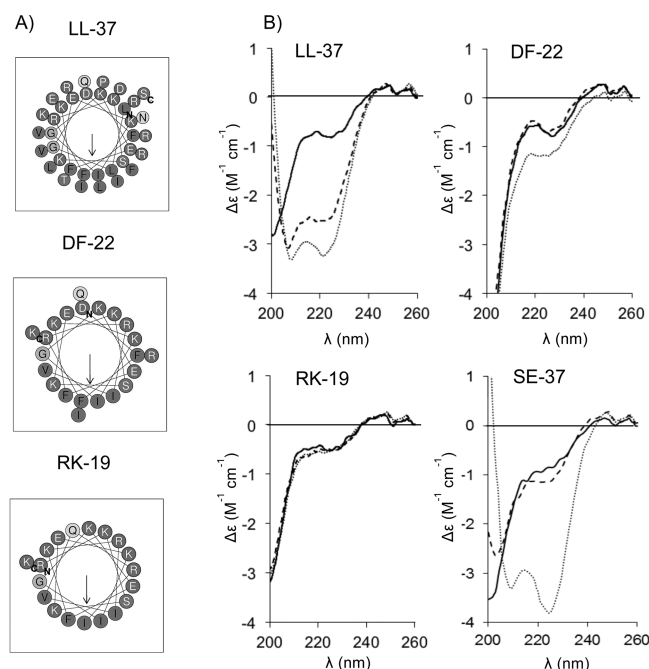


Figure 5. Secondary structure of LL-37 and its derivatives. (A) Helical wheel representation of LL-37, SE-37, DF-22, and RK-19 at pH 7.4 (<http://heliquet.ipmc.cnrs.fr>). The hydrophobic face is indicated with an arrow. Charged residues are mostly oriented to the opposite side. The N- and C-termini of each peptide are indicated. (B) CD spectra of LL-37, DF-22, RK-19, and SE-37 (20 μ M) in water (full line) 100 mM phosphate sodium buffers (pH 5.5, dashed line, and 7.4, dotted line).

in the reverse orientation (Figure 7C). Pearson and Spearman correlation coefficients were 0.67 and 0.82, respectively. Peptides IG-19, IG-13, IG-25, RI-19, and KD-13, which did not inhibit CatL, exhibited a weaker binding energy compared to LL-37 truncated inhibitory peptides (LL-31, LL-25, LL-19, LL-13, RK-31, RK-25, and RK-19). Conversely, no significant correlation was measured when LL-37 truncated peptides were in the forward orientation.

DISCUSSION

As a key component of the innate immune system, the interest in LL-37 has been growing worldwide during the past decade. In CF, the innate immunity of the lungs is compromised, resulting to chronic infections by opportunistic pathogens (mainly *P. aeruginosa* and *S. aureus*). This defect is partially attributed to the inactivation of major AMPs including LL-37. A number of prior studies reported that cysteine cathepsins B, K, L, and S are expressed in human lung and their protein expression levels are increased during CF.^{21,47} Moreover, several lines of evidence support that CatB, L, K, and S are involved in the proteolysis of structurally and functionally different AMPs such as lactoferrin, SLPI, SP-A, hBD-2 and -3.^{21–24} However, we report here the presence of immunoreactive forms of LL-37 and its precursor hCAP-18 in the excretions of CF patients. Subsequently these findings prompted us to investigate whether LL-37 is an inhibitor, a substrate, or combines both functions toward cathepsins. Previously, human cathelin-like domain (CLD), the N-terminal prodomain of hCAP-18, was described to inhibit at high concentration the peptidase activity of CatL.¹³ In contrast, the CLD of porcine protegrin-3 enhanced CatL activity.⁴⁸ In both cases, authors suggested that CLD could interact with the active

site of CatL, and putative conformational changes may occur, switching the CLD to act as an inhibitor or activator of CatL. Even though both human CLD and chicken cystatin share a common structural fold, the former lacks the three functional motifs of cystatins that are specifically involved in the inhibition of cysteine proteases (for review, see ref 48). Therefore, it could not be excluded that CLD might be a competitive substrate of CatL. Recently, it has been reported that human CLD was inactive against CatL, whereas both pro-cathelicidin and LL-37 impaired in a dose-dependent manner the CatL peptidase activity.¹⁷ It has been suggested that LL-37 is likely the inhibitory domain of hCAP18/LL-37 against CatL. In light of these paradoxical reports, we decided first to characterize in detail the mode of inhibition of CatL by LL-37. We demonstrated that LL-37 is a selective and competitive CatL inhibitor, and that its positive charge and the sequence of LL-37 are critical for the inhibition of CatL. No apparent inhibition of the closely related Cats K, S, and B was measured in the presence of LL-37. In contrast, CatK, S, and to a lesser extent CatB degrade readily LL-37 *in vitro*, suggesting that singular residues located within the active site of CatL interact with LL-37. This selective interaction between CatL and LL-37 can be relinquished by altering two amino acids in the S2 pocket of the binding site of CatL (Leu67 and Ala205) into residues present in the CatK S2 subsite.⁴⁶ This double mutant (Leu67Tyr/Ala205Leu) became a potent LL-37-degrading CatL variant similar to CatK. In contrast, the (Tyr67Leu/Leu205Ala) CatK mutant lost most of its LL-37 degrading ability and was partially inhibited by this peptide. These findings underline the importance of residues Leu67 and Ala205 (papain numbering) for the interaction of LL-37 with CatL. Furthermore, as supported by *in vitro* and *in silico* experiments, LL-37 may adopt two directions in the active site of CatL (i.e., in a forward or in a reverse direction to the conventional substrate binding cleft). This latter arrangement may confer an inhibitory capacity of LL-37 against CatL as previously observed for the propeptide of CatL that covers the substrate-binding site of CatL in an opposite direction to that of the bound substrate.⁴⁹ To our knowledge, CatL is the only human cysteine cathepsin identified to date that is inhibited by LL-37. This may contribute in part to the presence of LL-37 in CF sputum despite the presence of elevated concentrations of active CatL, which is the most abundant cysteine endopeptidase with CatB in comparison to CatS and CatK.³³ While the current study characterized the mode of inhibition, the impact of the inhibitory capacity of LL-37 *in vivo* remains unclear, in particular, whether LL-37 affects the proteolytic activity of CatL in the ECM, and further studies are clearly warranted.

On the other hand, we found that cysteine cathepsins from treated non-CF human alveolar macrophages readily cleaved LL-37, suggesting the role of cathepsins in the degradation of LL-37 *in vivo*. We identified that, among the cysteine endopeptidases expressed by alveolar macrophages, CatK and S are the most effective cathepsins to degrade LL-37 *in vitro*. As a result, both CatK and S abolished the antimicrobial activity of LL-37 against *P. aeruginosa*, *E. coli*, and *S. aureus*. Alternatively, submitting macrophages lysates to CA-074, a selective inhibitor of CatB, reduced the degradation of LL-37. The housekeeping CatB activity accounted for ~50% (e.g., ~2.4 μ M) of the total cathepsin endopeptidase activities in macrophages lysates (data not shown). This suggests that a high concentration of CatB is probably required to cleave LL-37, in agreement with our experimental assays. Therefore, cysteine cathepsins participate

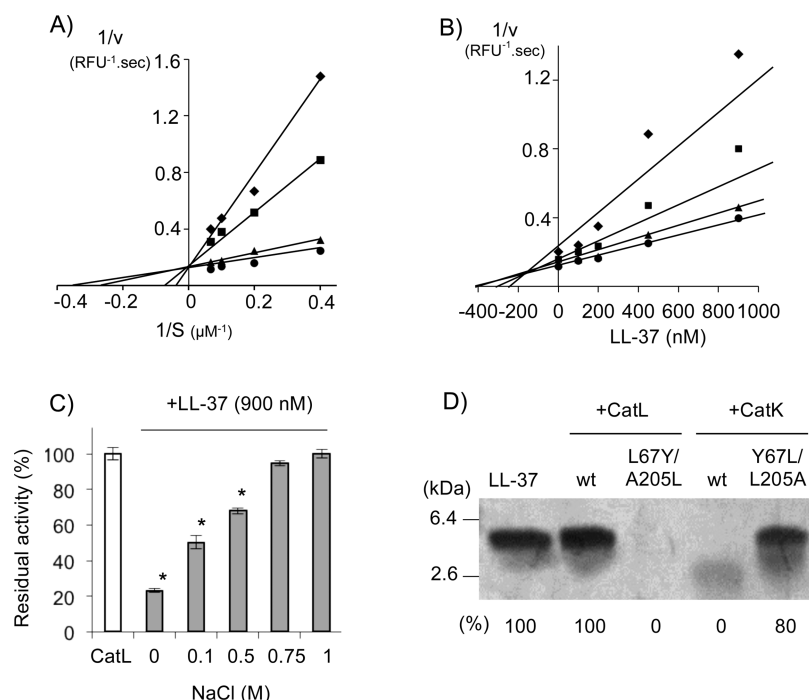


Figure 6. Inhibition of CatL by LL-37. (A) CatL (2 nM) was incubated either alone (filled circle) or with LL-37 (900 nM: filled diamond, 450 nM: filled square and 200 nM: filled triangle) in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, 2 mM DTT, and 0.01% Brij35. Residual activity was measured toward the fluorogenic substrate (S) Z-Phe-Arg-AMC (2.5–20 μ M). Determination of type of inhibition was performed using the Lineweaver–Burk plot. The velocity (v) is expressed as relative fluorescence emission units (RFU) per second. (B) Dixon plot representation. CatL (2 nM) was incubated with increasing concentrations of LL-37, and residual activity was monitored against different concentrations of Z-Phe-Arg-AMC (2.5 μ M: filled diamond, 5 μ M: filled square, 10 μ M: filled triangle, 15 μ M: filled circle). (C) Residual activity of CatL (2 nM) in the presence of LL-37 (900 nM) and increasing concentrations of NaCl (0.1–1 M). Assays were performed in triplicate ($n = 2$). Residual activity is expressed as percentage of the corresponding control. Statistical analysis was performed with a two-way Mann and Whitney U test (*: $p < 0.02$). (D) LL-37 (89 μ M) was incubated with CatL, K, and their respective S2 mutant (20 nM) for 1 h at 37 °C. Samples were separated on a 8–25% SDS-PAGE under reducing conditions, and gels were Coomassie stained with Brilliant Blue G-250.

Table 3. Inhibition of CatL by LL-37 Truncated Peptide Library^a

Peptide	Sequence	AGADIR	Inhibition (%) (mean $\pm$ SD)
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	5.10	74.5 $\pm$ 1 *
LL-31	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNL	3.72	66.5 $\pm$ 1 *
LL-25	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIK	1.19	48.8 $\pm$ 2 *
LL-19	LLGDFFRKSKEKIGKEFKR	0.92	27.2 $\pm$ 6 *
LL-13	LLGDFFRKSKEKI	0.84	15.5 $\pm$ 2 *
RK-25	RKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNL	4.06	18.7 $\pm$ 2 *
IG-19	IGKEFKRIVQRIKDFLRNL	4.33	0.9 $\pm$ 2
RK-19	RKSKEKIGKEFKRIVQRIK	0.73	10.3 $\pm$ 7 *
IG-13	IGKEFKRIVQRIK	0.71	0
RK-31	RKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	5.68	35.6 $\pm$ 5 *
IG-25	IGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	5.87	0
RI-19	RIVQRIKDFLRNLPRTES	2.08	0
KD-13	KDFLRNLPRTES	0.09	0

^aResidual activity of CatL (2 nM) toward Z-Phe-Arg-MCA (20 μ M) in the presence of LL-37 truncated peptides (900 nM). Assays were performed in triplicate ($n = 2$) (*, $p < 0.02$).

in concert with other identified proteases in the degradation of numerous key innate immunity peptides/proteins, including LL-37, and thus may display immunomodulatory activities during CF.⁵⁰ Nevertheless, the degree to which AMPs are

cleaved and inactivated by cysteine cathepsins during CF may depend on cellular components present in the altered pulmonary milieu. Intriguingly, contrary to LL-37, defensin hBD-2 and surfactant protein SP-A were extensively degraded

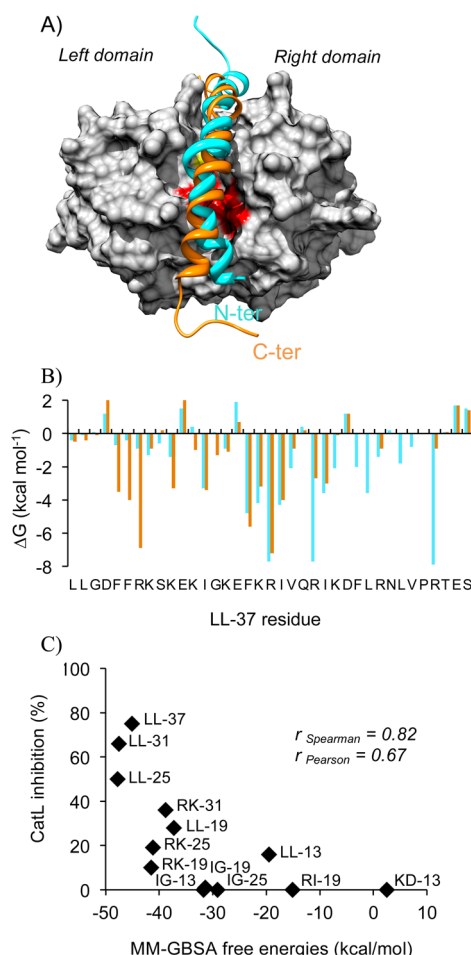


Figure 7. Molecular modeling of LL-37 recognition by CatL. (A) Molecular docking of LL-37 in the forward (blue helix) and reverse orientation (orange helix) into the active site cleft of CatL (gray surface). The residues of the S2 pocket of CatL are highlighted as a red surface and residue Cys25 of the active site in yellow. (B) MM-GBSA per residue free energy decomposition for LL-37 in the forward (blue bar) and the reverse (orange bar) orientations. (C) MM-GBSA free energies for truncated LL-37 peptides in the reverse orientation are plotted against the inhibition of CatL. The significance of the correlation between MM-GBSA free energies and inhibition was assessed with Spearman and Pearson coefficients.

Table 4. MM-GBSA Binding Free Energy (kcal/mol) of LL-37 with CatL

	ΔG_{total}	ΔG_{elect}	ΔG_{vdw}
LL-37			
forward position	-81.1 ± 7.7	-1650.9 ± 72.4	-92.4 ± 9.2
reverse position	-73.4 ± 7.5	-1594.5 ± 66.1	-83.4 ± 9.0

in both Ps+ and Ps- CF samples tested (data not shown). Moreover hBD-2 is susceptible to degradation and inactivation by cysteine cathepsins B, L, and S,²¹ while SP-A is degraded specifically by CatS *in vitro*.²⁴ One plausible explanation of the presence of intact LL-37 is the binding of LL-37 to anionic molecules (e.g., DNA, F-actin, and GAGs) may protect it from proteolysis by CatS and CatK in CF sputum, as it has been previously reported for different host proteases including serine and acidic proteases (HNE, proteinase 3, and CatD)³⁹ as well as proteases released from *P. aeruginosa* and *S. aureus*.^{51,52} McElvaney and colleagues reported that high sodium

concentration is required to liberate LL-37 in CF bronchoalveolar lavage suggesting that LL-37 binds tightly to GAGs, likely due to electrostatic interactions.³⁹ Consistently, we report that high concentrations (0.15%) of sulfated GAGs (C4-S, HS, and HP) protect LL-37 from proteolysis by CatK and S similarly to that observed for other proteases.^{39,51–54} A consensus heparin-binding cardin motif XBBXB (where X represents hydrophobic or uncharged residue, and B represents a basic residue) is found at the N-terminal part of LL-37 between Phe6 and Glu11. This site was sensitive to cleavage by CatK and S. Protection of LL-37 by sulfated GAGs (0.15%) was partially impaired by 150 mM NaCl and fully abolished at higher concentrations (500 mM), except for HP, which is the most sulfated GAG with an average of ~2.5 sulfate groups/disaccharide, while C4-S and HS have ~0.9 sulfate group/disaccharide. Moreover, we previously characterized that CatS peptidase activity was inhibited by C4-S and HS in a dose-dependent manner,⁵⁵ which mounted up in the resistance of LL-37 to proteolysis.

It would be interesting to determine whether cysteine cathepsins operate similarly in skin and other sites where LL-37 is found. It was proposed that host proteases, including CatK, elastase, CatG, and MMP-9, present in the gingival crevicular fluid from periodontitis patients, may contribute in concert with bacterial proteases to the degradation of LL-37.⁵⁶ Furthermore, since LL-37 is expressed in different tissues either constitutively or induced during inflammation, it cannot be ruled out that the hydrolysis of LL-37, which is cytotoxic to eukaryotic cells at a high concentration, by cysteine cathepsins is beneficial.^{44,57,58} Taken together with other studies, we provide further indication that cysteine cathepsins are new biologically relevant players in the process of degradation and inactivation of major AMPs including, SLPI, lactoferrin, SP-A, and LL-37. More broadly, the importance of regulating the activity of cathepsins for control of antimicrobial activity in lungs may be critical in the pathophysiology of CF.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Address: 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) 24736604. E-mail: fabien.lecaille@univ-tours.fr.

Funding

We acknowledge the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) for institutional funding. P.M.A. holds a doctoral fellowship from INSERM and the Région Centre, France. M.T.P. group is funded by the German Research Council (SFB-TRR67; A7). K.N. and J.G.M.B. were supported by a grant from the University of Amsterdam for research into the focal point Oral Infections and Inflammation.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We kindly thank Dr. Sylvain Marchand-Adam (Inserm UMR 1100, Service de Pneumologie, CHRU de Tours, France) for providing human BALF and Dr. Patrick Plésiat (Laboratoire de Bactériologie, CHU Saint Jean Minjoz, Besançon, France) for CF sputum samples. We thank Dr. Ahlame Saidi (Inserm UMR 1100, Tours, France) for her technical assistance. Mu-Leu-Hph-

VSPH was kindly provided by Dr. J. H. McKerrow (Skaggs School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, University of California San Diego, La Jolla, CA, USA).

ABBREVIATIONS

AEBSEF, 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride; BALF, bronchoalveolar lavage fluid; Cat, cysteine cathepsin; CA-074, *N*-(1-3-trans-propylcarbamoyloxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline; CD, circular dichroism; CF, cystic fibrosis; CLD, cathelin-like domain; DTT, dithiothreitol; E-64, L-3-carboxy-trans-2,3-epoxy-propionyl-leucylamide-(4-guaniido)-butane; ECM, extracellular matrix; GAGs, glycosaminoglycans; HAM, human alveolar macrophage; hBD, human beta-defensin; hCAP, human cathelicidin antimicrobial peptide; HNE, human neutrophil elastase; LHVS, morpholinourea-leucyl-homophenylalanine-vinyl-sulfone; MIC, minimal inhibitory concentration; MD, molecular dynamic; MM-GBSA, molecular mechanics-generalized Born surface area; MMTS, S-methyl thiomethanesulfonate; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; proCat, procathepsin; SP-A, surfactant protein A

REFERENCES

- (1) Hiemstra, P. S. (2007) The role of epithelial beta-defensins and cathelicidins in host defense of the lung. *Exp. Lung Res.* 33, 537–542.
- (2) Gallo, R. L., and Nizet, V. (2003) Endogenous production of antimicrobial peptides in innate immunity and human disease. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 3, 402–409.
- (3) Smith, J. J., Travis, S. M., Greenberg, E. P., and Welsh, M. J. (1996) Cystic Fibrosis Airway Epithelia Fail to Kill Bacteria Because of Abnormal Airway Surface Fluid. *Cell* 85, 229–236.
- (4) Bals, R., Weiner, D. J., Meegalla, R. L., Accurso, F., and Wilson, J. M. (2001) Salt-Independent Abnormality of Antimicrobial Activity in Cystic Fibrosis Airway Surface Fluid. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25, 21–25.
- (5) Goldman, M. J., Anderson, G. M., Stolzenberg, E. D., Kari, U. P., Zasloff, M., and Wilson, J. M. (1997) Human β -Defensin-1 Is a Salt-Sensitive Antibiotic in Lung That Is Inactivated in Cystic Fibrosis. *Cell* 88, 553–560.
- (6) Weiner, D. J., Bucki, R., and Janmey, P. A. (2003) The Antimicrobial Activity of the Cathelicidin LL37 Is Inhibited by F-actin Bundles and Restored by Gelsolin. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28, 738–745.
- (7) Bucki, R., Byfield, F. J., and Janmey, P. A. (2007) Release of the antimicrobial peptide LL-37 from DNA/F-actin bundles in cystic fibrosis sputum. *Eur. Respir. J.* 29, 624–632.
- (8) Herasimenka, Y., Benincasa, M., Mattiuzzo, M., Cescutti, P., Gennaro, R., and Rizzo, R. (2005) Interaction of antimicrobial peptides with bacterial polysaccharides from lung pathogens. *Peptides* 26, 1127–1132.
- (9) Benincasa, M., Mattiuzzo, M., Herasimenka, Y., Cescutti, P., Rizzo, R., and Gennaro, R. (2009) Activity of antimicrobial peptides in the presence of polysaccharides produced by pulmonary pathogens. *J. Pept. Sci.* 15, 595–600.
- (10) Bucki, R., Namiot, D. B., Namiot, Z., Savage, P. B., and Janmey, P. A. (2008) Salivary mucins inhibit antibacterial activity of the cathelicidin-derived LL-37 peptide but not the cationic steroid CSA-13. *J. Antimicrob. Chemother.* 62, 329–335.
- (11) Chen, C. I.-U., Schaller-Bals, S., Paul, K. P., Wahn, U., and Bals, R. (2004) β -defensins and LL-37 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with cystic fibrosis. *J. Cystic Fibrosis* 3, 45–50.
- (12) Xiao, W., Hsu, Y.-P., Ishizaka, A., Kirikae, T., and Moss, R. B. (2005) Sputum cathelicidin, urokinase plasminogen activation system components, and cytokines discriminate cystic fibrosis, COPD, and asthma inflammation. *Chest* 128, 2316–2326.
- (13) Zaiou, M., Nizet, V., and Gallo, R. L. (2003) Antimicrobial and Protease Inhibitory Functions of the Human Cathelicidin (hCAP18/LL-37) Prosequence. *J. Invest. Dermatol.* 120, 810–816.

- (14) Morizane, S., Yamasaki, K., Kabigting, F. D., and Gallo, R. L. (2010) Kallikrein expression and cathelicidin processing are independently controlled in keratinocytes by calcium, vitamin D(3), and retinoic acid. *J. Invest. Dermatol.* 130, 1297–1306.
- (15) Sørensen, O. E., Follin, P., Johnsen, A. H., Calafat, J., Tjabringa, G. S., Hiemstra, P. S., and Borregaard, N. (2001) Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* 97, 3951–3959.
- (16) Eick, S., Puklo, M., Adamowicz, K., Kantyka, T., Hiemstra, P., Stennicke, H., Guentsch, A., Schacher, B., Eickholz, P., and Potempa, J. (2014) Lack of cathelicidin processing in Papillon-Lefèvre syndrome patients reveals essential role of LL-37 in periodontal homeostasis. *Orphanet. J. Rare Dis.* 9, 148.
- (17) Pazgier, M., Ericksen, B., Ling, M., Toth, E., Shi, J., Li, X., Galliher-Beckley, A., Lan, L., Zou, G., Zhan, C., Yuan, W., Pozharski, E., and Lu, W. (2013) Structural and functional analysis of the pro-domain of human cathelicidin, LL-37. *Biochemistry* 52, 1547–1558.
- (18) Lee, C.-C., Sun, Y., Qian, S., and Huang, H. W. (2011) Transmembrane Pores Formed by Human Antimicrobial Peptide LL-37. *Biophys. J.* 100, 1688–1696.
- (19) Scott, M. G., Davidson, D. J., Gold, M. R., Bowdish, D., and Hancock, R. E. W. (2002) The Human Antimicrobial Peptide LL-37 Is a Multifunctional Modulator of Innate Immune Responses. *J. Immunol.* 169, 3883–3891.
- (20) Linde, A., Lushington, G. H., Abello, J., and Melgarejo, T. (2013) Clinical Relevance of Cathelicidin in Infectious Disease. *J. Clin. Cell. Immunol.* S-13, 003.
- (21) 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.
- (22) 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.
- (23) 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.
- (24) Lecaillon, F., Naudin, C., Sage, J., Joulin-Giet, A., Courty, A., Andrault, P.-M., Veldhuizen, R. A. W., Possmayer, F., and Lalmanach, G. (2013) Specific cleavage of the lung surfactant protein A by human cathepsin S may impair its antibacterial properties. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 1701–1709.
- (25) Veillard, F., Lecaillon, 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.
- (26) Fonović, M., and Turk, B. (2014) Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 2560–2570.
- (27) Lalmanach, G., Saidi, A., Marchand-Adam, S., Lecaillon, F., and Kasabova, M. (2015) Cysteine cathepsins and cystatins: from ancillary tasks to prominent status in lung diseases. *Biol. Chem.* 396, 111–130.
- (28) Lecaillon, F., Vandier, C., Godat, E., Hervé-Grépinet, V., Brömme, D., and Lalmanach, G. (2007) Modulation of hypotensive effects of kinins by cathepsin K. *Arch. Biochem. Biophys.* 459, 129–136.
- (29) Serveau, C., Moreau, T., Zhou, G. X., ElMoujahed, A., Chao, J., and Gauthier, F. (1992) Inhibition of rat tissue kallikrein gene family members by rat kallikrein-binding protein and alpha 1-proteinase inhibitor. *FEBS Lett.* 309, 405–408.
- (30) Den Hertog, A. L., van Marle, J., Veerman, E. C. I., Valentijn-Benz, M., Nazmi, K., Kalay, H., Grün, C. H., Van't Hof, W., Bolscher, J. G. M., and Nieuw Amerongen, A. V. (2006) The human cathelicidin peptide LL-37 and truncated variants induce segregation of lipids and proteins in the plasma membrane of *Candida albicans*. *Biol. Chem.* 387, 1495–1502.
- (31) Godat, E., Chowdhury, S., Lecaillon, F., Belghazi, M., Purisima, E. O., and Lalmanach, G. (2005) Inhibition of a cathepsin L-like cysteine

protease by a chimeric propeptide-derived inhibitor. *Biochemistry* 44, 10486–10493.

(32) Kasabova, M., Joulin-Giet, A., Lecaille, F., Saidi, A., Marchand-Adam, S., and Lalmanach, G. (2014) Human cystatin C: a new biomarker of idiopathic pulmonary fibrosis? *Proteomics Clin. Appl.* 8, 447–453.

(33) 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.

(34) Lehrer, R. I., Rosenman, M., Harwig, S. S. L., Jackson, R., and Eisenhauer, P. (1991) Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol. Methods* 137, 167–173.

(35) Kyte, J., and Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105–132.

(36) Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., and Camacho, C. J. (2004) ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res.* 32, W96–99.

(37) Case, D. A., Darden, T. A., Cheatham, T. E., Simmerling, C. L., Wang, J., Duke, R. E., Luo, R., Walker, R. C., Zhang, W., Merz, K. M., Wang, B., Hayik, S., Roitberg, A., Seabra, G., Kolossvary, I., Wong, K. F., Paesani, F., Vanicek, J., Liu, J., Wu, X., Brozell, S. R., Steinbrecher, T., Gohlke, H., Cai, Q., Ye, X., Wang, J., Hsieh, M.-J., Hornak, V., Cui, G., Roe, D. R., Mathews, D. H., Seetin, M. G., Sagui, C., Babin, V., Luchko, T., Gusarov, S., Kovalenko, A., Kollman, P. A., and Roberts, B. P. (2010) Amber 11, University of California. Available from: <http://infoscience.epfl.ch/record/150146>.

(38) R Team (2006) *R Lang. Environ. Stat. Comput.*, <http://www.R-project.org>.

(39) Bergsson, G., Reeves, E. P., McNally, P., Chotirmall, S. H., Greene, C. M., Greally, P., Murphy, P., O'Neill, S. J., and McElvaney, N. G. (2009) LL-37 Complexation with Glycosaminoglycans in Cystic Fibrosis Lungs Inhibits Antimicrobial Activity, Which Can Be Restored by Hypertonic Saline. *J. Immunol.* 183, 543–551.

(40) Strömstedt, A. A., Pasupuleti, M., Schmidtchen, A., and Malmsten, M. (2009) Evaluation of Strategies for Improving Proteolytic Resistance of Antimicrobial Peptides by Using Variants of EFK17, an Internal Segment of LL-37. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53, 593–602.

(41) Vandamme, D., Landuyt, B., Luyten, W., and Schoofs, L. (2012) A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell. Immunol.* 280, 22–35.

(42) Braff, M. H., Hawkins, M. A., Di Nardo, A., Lopez-Garcia, B., Howell, M. D., Wong, C., Lin, K., Streib, J. E., Dorschner, R., Leung, D. Y. M., and Gallo, R. L. (2005) Structure-function relationships among human cathelicidin peptides: dissociation of antimicrobial properties from host immunostimulatory activities. *J. Immunol.* 174, 4271–4278.

(43) Molhoek, E. M., den Hertog, A. L., de Vries, A.-M. B. C., Nazmi, K., Veerman, E. C. I., Hartgers, F. C., Yazdanbakhsh, M., Bikker, F. J., and van der Kleij, D. (2009) Structure-function relationship of the human antimicrobial peptide LL-37 and LL-37 fragments in the modulation of TLR responses. *Biol. Chem.* 390, 295–303.

(44) Johansson, J., Gudmundsson, G. H., Rottenberg, M. E., Berndt, K. D., and Agerberth, B. (1998) Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J. Biol. Chem.* 273, 3718–3724.

(45) Choe, Y., Leonetti, F., Greenbaum, D. C., Lecaille, F., Bogoy, M., Brömme, D., Eelman, J. A., and Craik, C. S. (2006) Substrate profiling of cysteine proteases using a combinatorial peptide library identifies functionally unique specificities. *J. Biol. Chem.* 281, 12824–12832.

(46) 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.

(47) Weldon, S., McNally, P., McAuley, D. F., Oglesby, I. K., Wohlford-Lenane, C. L., Bartlett, J. A., Scott, C. J., McElvaney, N. G.,

Greene, C. M., McCray, P. B., and Taggart, C. C. (2014) miR-31 dysregulation in cystic fibrosis airways contributes to increased pulmonary cathepsin S production. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190, 165–174.

(48) Zhu, S., Wei, L., Yamasaki, K., and Gallo, R. L. (2008) Activation of cathepsin L by the cathelin-like domain of protegrin-3. *Mol. Immunol.* 45, 2531–2536.

(49) Coulombe, R., Grochulski, P., Sivaraman, J., Ménard, R., Mort, J. S., and Cygler, M. (1996) Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *EMBO J.* 15, 5492–5503.

(50) 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.

(51) Schmidtchen, A., Frick, I.-M., Andersson, E., Tapper, H., and Björck, L. (2002) Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol. Microbiol.* 46, 157–168.

(52) Sieprawska-Lupa, M., Mydel, P., Krawczyk, K., Wójcik, K., Puklo, M., Lupa, B., Suder, P., Silberring, J., Reed, M., Pohl, J., Shafer, W., McAleese, F., Foster, T., Travis, J., and Potempa, J. (2004) Degradation of Human Antimicrobial Peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-Derived Proteinases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 4673–4679.

(53) Koziel, J., Karim, A. Y., Przybyszewska, K., Ksiazek, M., Rapala-Kozik, M., Nguyen, K.-A., and Potempa, J. (2010) Proteolytic inactivation of LL-37 by karilysin, a novel virulence mechanism of *Tannerella forsythia*. *J. Innate Immun.* 2, 288–293.

(54) Belas, R., Manos, J., and Suvanasuthi, R. (2004) *Proteus mirabilis* ZapA metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides. *Infect. Immun.* 72, 5159–5167.

(55) Sage, J., Mallèvre, F., Barbarin-Costes, F., Samsonov, S. A., Gehrcke, J.-P., Pisabarro, M. T., Perrier, E., Schnebert, S., Roget, A., Livache, T., Nizard, C., Lalmanach, G., and Lecaille, F. (2013) Binding of Chondroitin 4-Sulfate to Cathepsin S Regulates Its Enzymatic Activity. *Biochemistry* 52, 6487–6498.

(56) McCrudden, M. T. C., Orr, D. F., Yu, Y., Coulter, W. A., Manning, G., Irwin, C. R., and Lundy, F. T. (2013) LL-37 in periodontal health and disease and its susceptibility to degradation by proteinases present in gingival crevicular fluid. *J. Clin. Periodontol.* 40, 933–941.

(57) Tjallingii, S. G., Rabe, K. F., and Hiemstra, P. S. (2005) The human cathelicidin LL-37: a multifunctional peptide involved in infection and inflammation in the lung. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 18, 321–327.

(58) Nan, Y. H., Bang, J.-K., Jacob, B., Park, I.-S., and Shin, S. Y. (2012) Prokaryotic selectivity and LPS-neutralizing activity of short antimicrobial peptides designed from the human antimicrobial peptide LL-37. *Peptides* 35, 239–247.

2. Les cathepsines à cystéine dans la BPCO

Article 2: Regulation of Cathepsin S Expression and Activity by Cigarette Smoke in Airway Epithelium of COPD Patients

Pierre-Marie Andrault, Andrea Schamberger, Lise Vanderlynden, Serge Guyetant, Agnès Petit, Oliver Eickelberg, Yves Courty, Gilles Lalmanach & Fabien Lecaille (*manuscrit en préparation*)

Introduction : La Broncho Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est une pathologie inflammatoire pulmonaire majoritairement associée au tabagisme (90%) et qui se caractérise par une bronchite chronique accompagnée d'une hypersécrétion de mucus et d'un emphysème pulmonaire. Selon l'OMS, elle deviendra la 3^{ème} cause de mortalité dans le monde d'ici 2020 et il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement curatif. La récurrence des infections pulmonaires bactériennes et virales associées à la BPCO augmente le risque d'exacerbation de la maladie. D'autre part, des modèles murins exposés à une combinaison de fumée de cigarette et d' *H. influenzae* inactivé par la chaleur développent les symptômes de la BPCO comparables à ceux observés chez l'Homme (Herr *et al.*, 2015). Durant l'inflammation, l'activation des neutrophiles et des macrophages provoque une libération massive de protéases (protéases à sérine, métalloprotéases et cathepsines à cystéine) et d'agents oxydants (péroxyde d'hydrogène, peroxy-nitrites, acide hypochloreux) qui contribuent à la fois au déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases et à celui de la balance oxydants/antioxydants (Owen, 2005; Wada & Takizawa, 2013). La caractérisation ainsi que le(s) rôle(s) des cathepsines à cystéine humaines dans les processus physiopathologiques associés à la BPCO restent encore assez mal connus. D'autre part, l'expression des PAMs comme les α - et β -défensines, le SLPI, l'élaïne, le LL-37 et les collectines SP-A et SP-D est augmentée dans la BPCO stable tandis que le SLPI et l'élaïne sont diminués dans la BPCO exacerbée. La régulation protéolytique des PAMs associée au stress oxydatif lié à la fumée de cigarette reste peu caractérisée à ce jour. La fumée de cigarette inspirée contient près de 10^{14} radicaux libres par bouffées comme les radicaux alkoxyl (RO $\cdot$), peroxy (RO $_2\cdot$) et semiquinone (Q $\cdot$) et la phase gazeuse contient également des agents oxydants comme les peroxy-nitrites et le peroxyde d'hydrogène (Nakayama *et al.*, 1989; Pryor & Stone, 1993; Zang *et al.*, 1995). L'environnement oxydant lié à la fumée de cigarette constitue un milieu

défavorable pour l'activité des cathepsines à cystéine, cependant certaines d'entre elles, notamment la cathepsine B est retrouvée sous forme active et en quantité importante dans des lavages bronchoalvéolaires de patients fumeurs (Chang *et al.*, 1986). L'inhibition pharmacologique des cathepsines B, H, K, L et S chez des souris transgéniques souffrant de BPCO induite par une surexpression en IFN- γ ou en IL-13 protège l'animal contre l'emphysème pulmonaire (Zheng *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2000). D'autre part, l'expression des cathepsines B et S par des macrophages pulmonaires et dépendante de l'IL-18 est augmentée sur des souris traitées à la fumée de cigarette (Kang *et al.*, 2007). De façon intéressante, des modèles murins exposés à l'ozone sur-expriment la cathepsine S comparativement aux souris non traitées, et l'inhibition de l'enzyme réduit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6) et l'infiltration pulmonaire des neutrophiles induite par l'oxydant (Williams *et al.*, 2009). Il semblerait donc que la cathepsine S participe au développement de l'inflammation pulmonaire liée au stress oxydatif dans la BPCO.

Objectifs : Parmi les différentes cathepsines humaines exprimées dans le poumon, la cathepsine S, qui possède une importante activité collagénolytique et élastinolytique et qui est également capable de dégrader un certain nombre de PAMs, est une candidate de choix dans l'étude des remodelages pulmonaires et de l'immunité innée, associés à la BPCO. Les principaux objectifs sont : 1) de caractériser l'expression de la cathepsine S chez des patients BPCO (tissus pulmonaires et expectorations) en fonction de la sévérité de la maladie (GOLD I-III), et 2) d'étudier l'influence de la fumée de cigarette sur l'expression de la cathepsine S dans un modèle cellulaire bronchique humain et de mesurer l'impact sur son activité protéolytique vis-à-vis du peptide LL-37.

Résultats : Nous avons examiné l'expression par Western blot des cathepsines B, H, L et S dans des échantillons de tissus pulmonaires humains provenant de patients non-fumeurs (n=10), fumeurs (n=20) et fumeurs atteints de BPCO (n=42). Parmi les fumeurs, nous disposons d'échantillons d'anciens fumeurs et fumeurs actuels et également d'échantillons BPCO classés par stades de sévérité (GOLD I-III). L'expression des cathepsines B, H, L et S (formes matures) est significativement augmentée chez les patients fumeurs atteints ou non de BPCO comparé aux patients non-fumeurs. D'autre part, l'augmentation de la cathepsine S chez les individus fumeurs atteints ou non de BPCO est plus importante (facteur 3 à 5) par rapport aux cathepsines B, H et L (facteur 2 à 3). L'évaluation du stress oxydatif dans les tissus a montré que la capacité anti-oxydante est plus faible chez les patients fumeurs atteints ou non de BPCO (excepté pour les anciens fumeurs non BPCO) corroborant ainsi les travaux

de Tavalani et ses collaborateurs (Tavalani *et al.*, 2012). D'autre part, l'utilisation d'une sonde biotinylée spécifique du site actif des cathepsines à cystéine a permis de mettre en évidence des cathepsines actives, malgré le stress oxydatif présent dans ces échantillons biologiques. De plus, nous n'avons pas remarqué de variation d'expression de la stéfine B, un inhibiteur endogène des cathepsines, ce qui suggère un déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases en faveur de la protéolyse dans ces échantillons. Nous avons également examiné l'expression de l'IFN- γ qui est capable de stimuler l'expression de la cathepsine S dans de nombreux types cellulaires (cellules musculaires lisses, cellules endothéliales) (Sukhova *et al.*, 1998; Shi *et al.*, 2003). En dépit d'une augmentation significative de l'IFN- γ chez les patients fumeurs non-BPCO, nous n'avons cependant pas mesuré de corrélation entre le niveau d'expression de l'IFN- γ et l'expression de la cathepsine S chez les patients atteints de BPCO. L'analyse de l'expression de la cathepsine S dans des expectorations de patients BPCO stables et exacerbés a montré que la cathepsine S est plus importante chez les individus exacerbés. En parallèle, nous avons détecté principalement la proforme du peptide antimicrobien LL-37, hCAP-18, alors que le peptide mature LL-37 n'est pas ou peu présent dans ces expectorations. Nous avons donc étudié la dégradation du LL-37 par la cathepsine S dans les expectorations de patients stables et exacerbés. Le peptide LL-37, incubé dans les expectorations de patients BPCO exacerbés, est complètement dégradé au bout de 24 h à pH 7.4, et l'hydrolyse est bloquée en présence d'E-64 ou de LHSV (un inhibiteur sélectif de la cathepsine S). A l'inverse, aucune dégradation du peptide LL-37 n'a été observée dans les expectorations de patients BPCO stables. Nous avons ensuite étudié l'impact de la fumée de cigarette sur l'expression et l'activité de la cathepsine S. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de cellules primaires bronchiques épithéliales humaines (pHBEs) traitées à la fumée de cigarette. L'exposition des cellules pendant 2 h à des doses croissantes d'extraits de fumée de cigarette (CSE: 0 à 20%) augmente de façon dose dépendante l'expression de la cathepsine S dans les lysats cellulaires comparé aux cellules non traitées. De façon intéressante, la fumée de cigarette stimule également l'expression de la catalase alors qu'elle diminue l'expression de la stéfine B de façon dose-dépendante. La mesure de l'activité endopeptidasique des cathepsines à cystéine totales dans ces échantillons montre que l'activité des cathepsines augmente en fonction de la dose de fumée de cigarette administrée. D'autre part, l'hydrolyse du peptide LL-37 par la cathepsine S est fortement augmentée en présence de fumée de cigarette. Ainsi, la diminution de l'expression des inhibiteurs endogènes des cathepsines à cystéine associée à l'augmentation des systèmes

antioxydants favoriserait l'activité protéolytique de la cathepsine S dans les cellules épithéliales bronchiques. De plus, l'activité peptidasique de la cathepsine S est plus résistante *in vitro* au stress oxydant de la fumée de cigarette par rapport aux cathepsines B, L, et K, qui sont inactivées de façon temps et dose dépendante par le CSE. D'autre part, l'inactivation de la cathepsine S par le CSE qui est moins importante à pH 7.4 qu'à pH 5.5 est annulée en présence d'agent réducteur (DTT). De la même manière, l'hydrolyse du LL-37 par la cathepsine S est bloquée en présence de doses croissantes en CSE et est restaurée par le DTT. Enfin, l'auto-maturation de la procathepsine S n'est pas perturbée en présence d'extraits de fumée de cigarette, suggérant que les proformes inactives de cathepsine S présentes en quantité importante dans les expectorations de patients BPCO peuvent servir de réservoir de cathepsine S active relarguée lors des phases d'exacerbation.

Conclusion : Notre étude montre que l'expression des cathepsines à cystéine, en particulier la cathepsine S est augmentée par le stress oxydatif lié à la fumée de cigarette dans les poumons de patients fumeurs atteints ou non de BPCO. La surexpression de la cathepsine S et la conservation de son activité protéolytique dans un environnement oxydant peuvent expliquer son rôle dans l'inflammation du tissu pulmonaire (emphysème) associée au tabagisme. D'autre part, la cathepsine S participerait également à la dégradation du peptide antimicrobien LL-37 durant la BPCO et pourrait favoriser la colonisation du poumon par des bactéries telles que *H. influenzae*, *S. pneumoniae* et *P. aeruginosa* et ainsi le risque d'exacerbation de la pathologie. Il sera intéressant d'étudier dans ce contexte la dégradation d'autres peptides antimicrobiens comme la protéine du surfactant SP-A, le SLPI et les β -défensines HBD-2 et -3 qui sont des substrats de la cathepsine S.

**Regulation of cathepsin S expression and activity
by cigarette smoke in airway epithelium of COPD patients**

Pierre-Marie Andrault¹, Andrea Schamberger², Lise Vanderlynden¹, Serge Guyetant^{1,3},
Agnès Petit¹, Oliver Eickelberg², Yves Courty¹, Gilles Lalmanach¹, Fabien Lecaille^{1,¶}

(Manuscrit en préparation)

1 INSERM, UMR 1100, Pathologies Respiratoires: Protéolyse et Aérosolthérapie, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, Equipe 2: « Mécanismes Protéolytiques dans l'Inflammation », Université François Rabelais, F-37032 Tours cedex, France.

2 Comprehensive Pneumology Center, Institute of Lung Biology and Disease, University Hospital, Ludwig-Maximilians-University and Helmholtz Zentrum München, Member of the German Center for Lung Research, Munich, Germany.

3 Service d'Anatomie et Cytologie Pathologique, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Tours, France.

¶Corresponding author information: Fabien Lecaille, PhD, INSERM, UMR 1100, CEPR, Université François Rabelais, Faculté de Médecine, 10 Boulevard Tonnellé, F-37032 Tours cedex, France. Tel: (+33) 247366047; e-mail: fabien.lecaille@univ-tours.fr

Running title: Cigarette smoke induces cathepsin S expression

Abbreviations:

AEBSF, 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride AMP, antimicrobial peptide and protein ; ASL, airway surface liquid ; BALF, bronchoalveolar lavage fluid ; BM, basement membrane; CA-074, N-(L-3-trans-propylcarbonyloxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline; Cat, cathepsin; CF, cystic fibrosis; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; ECM, extracellular matrix ; GOLD, global initiative for chronic obstructive lung disease; hCAP, human cathelicidin antimicrobial peptide ; LHVS, Morpholinourea-leucinyll-homophenylalanine-vinyl-sulfone; MMTS, S-Methyl thiomethanesulfonate; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; proCat, procathepsin.

Abstract:

Background: The damaging effects of cigarette smoke are well known in the pathogenesis of COPD. Cigarette smoke exposure induces molecular changes within the lung, including oxidative stress, inflammatory cells recruitment, decline of host defense and a protease/anti-protease imbalance. However, the influence of smoking and its cessation on human cysteine cathepsins during COPD is still unknown. Cathepsin S (Cat S) is a key player in tissue remodeling and innate immunity during chronic inflammatory lung diseases such as cystic fibrosis. Here, we analyzed the expression and activity of Cat S in lungs of COPD patients (current and former smokers), and in human primary bronchial epithelial cells (pHBECs) exposed to cigarette smoke extract (CSE).

Methods: Forty-two COPD lung tissue lysates from patients (current and former smokers, CS/FS) with different stages of severity (GOLD I-III), and non-COPD smokers (CS/FS, n=20) were studied and compared with non-smokers (n=10). Induced sputa from stable and exacerbated COPD patients were also tested. We investigated the effect of cigarette smoke on Cat S expression and activity in primary human bronchial epithelial cells (pHBECs) and studied the regulation of its activity by CSE *in vitro*.

Results: Cat S expression increased significantly in smokers with or without COPD compared with non-smokers ($p<0.01$) and its expression is related to smoking status, and correlated positively with acute exacerbation of COPD. Despite the presence of unfavorable oxidizing environment, Cat S was found proteolytically active in lung tissue and induced sputa from COPD patients. Cat S remained partially active in the presence of CSE and its inactivation was reversed by dithiothreitol. Moreover, Cat S was up-regulated in pHBECs exposed to CSE, and participated to LL-37 hydrolysis, a major antimicrobial peptide in lung.

Conclusion: Exposure to cigarette smoke may be harmful to lung homeostasis through the production of uncontrolled proteolytically active Cat S in COPD.

Keywords: cysteine cathepsin, oxidative stress, antimicrobial peptide, processing

Introduction:

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is one of the major causes of adult death and morbidity worldwide [1]. Although the prevalence of the disease is increasing, no therapies are currently available. Cigarette smoke is by far the major etiological factor in the pathogenesis of COPD, which is characterized by progressive and irreversible airflow obstruction, punctuated by exacerbation episodes. Cigarette smoke (CS) exposure contributes to chronic airway inflammation and pathological lung tissue remodeling by increasing the recruitment of inflammatory cells (neutrophils, macrophages). The burden of oxidative stress associated to CS enhances recurrent bacterial infections, and leads to protease-antiprotease imbalance [2]. The principal classes of human proteases expressed in human lungs are neutrophil serine proteases (NSP), matrix metalloproteases (MMP) and cysteine cathepsins [3]. Lysosomal cysteine cathepsins are produced by a wide variety of cell types such as fibroblasts, macrophages and epithelial cells, and can be active outside lysosomes (secretory vesicles, cytosol, mitochondria, nucleus and extracellular medium). Among them, cathepsins B, K, L and S play important roles in diverse physiological events and are capable of degrading many extracellular matrix and basement membrane constituents and antimicrobial peptides (AMPs) [4]. Moreover, similar to NSPs and MMPs, dysregulation of cysteine cathepsins expression may disrupt these normal biological processes and contribute to a number of diseases such as, to list a few, cancer, osteoporosis, arthritis, pulmonary emphysema, fibrosis, and neurodegenerative diseases [5,6]. In addition, several cathepsins, in particular cathepsin S (Cat S), a potent collagenase and elastase that is expressed in MHC class II dependent antigen-presenting cells, and epithelial cells, are thought to be critical players in chronic inflammatory lung diseases, including cystic fibrosis and COPD [7–9]. Contrary to other related cathepsin family members that are rapidly inactivated at neutral pH, Cat S remains stable, a property that enables it to be active extracellularly, particularly during tissue remodelling. Overexpression of Cat S is observed in mouse models of IL-13 and IFN- γ -stimulated COPD disease, and their inhibition by synthetic inhibitors reduces significantly the severity of emphysema and inflammation [10,11]. Whilst, high levels of secreted Cat S are found in macrophages incubated with bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from patients with COPD, the use of IFN- γ neutralising antibodies block its expression, supporting that IFN- γ stimulates Cat S expression and activity in different cell types (keratinocytes, monocytes) [12,13]. Other cytokines such as IL-1, TNF- α , and IL-13 also induce Cat S expression [11,14]. Interestingly, cigarette smoke extract (CSE) enhanced production of IL-18

(an IFN- γ inducing factor), which induces the expression of Cat S in lung macrophages of mice, as well as in human lung tissues from COPD smokers, as demonstrated by immunohistochemistry studies [8]. Although, Cat S regulation has been partially characterized in emphysema mouse models, its expression and activity as well as the expression of related members Cat B, H and L and their endogenous inhibitors are less evaluated in the airway epithelium of COPD patients. In particular, the regulation of Cat S activity by oxidative CSE has not been addressed. Moreover, in addition to ECM and BM constituents, Cat S may degrade various AMPs in CF lungs, including the human cathelicidin LL-37, a peptide involved in the first line of host airway defense [15]. Despite LL-37 expression is modified during COPD, its susceptibility to a proteolytic cleavage by Cat S upon cigarette smoke exposure has never been explored.

In this study, we investigated Cat S expression and activity in lung tissues from current and former smokers with various stages of COPD severity (GOLD I-III) and compare to non-COPD smokers and non-smokers. To gain a better understanding whether cigarette smoke has a direct impact on Cat S regulation, we selected human bronchial epithelial cells as a model, and studied the expression and activity of Cat S in response to CSE, as well as its ability to degrade LL-37, ECM and BM constituents, and characterized its stability to oxidative stress *in vitro*. Our data support that Cat S may be a key player in the pathogenesis of COPD, associated to cigarette smoke exposure. Indeed, despite that Cat S is sensitive to oxidation, its proteolytic activity remains fairly preserved in the presence of CSE, providing a possible explanation of the presence of active Cat S during lung inflammation.

Material and method:

Enzymes: Human cysteine cathepsins B, L, H, and S were supplied by Calbiochem (VWR International S.A.S., France). Human cathepsin K was a kind gift from Pr. D. Brömme (The University of British Columbia, Vancouver, Canada). Molar concentrations of cathepsins B, K, L and S were determined by active site titration using L-3-carboxy-trans-2, 3-epoxy-propionylleucylamide-(4-guanido)-butane (E-64) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Human procathepsin S was expressed in *E. coli* and purified as previously described [16]. Unless stated, cathepsin activity assays were performed in acetate sodium buffer 100 mM, pH 5.5, dithiothreitol (DTT) 5 mM, and Brij35 0.01%.

Substrates and inhibitors: Benzyloxycarbonyl-Phe-Arg-7-amino-4-methyl coumarin (Z-Phe-Arg-AMC), Benzyloxycarbonyl-Leu-Arg-7-amino-4-methyl coumarin (Z-Leu-Arg-AMC), recombinants human cystatin C, stefins A and B were purchased from R&D System (R&D System Europe, Abingdon, UK). Benzyloxycarbonyl-Val-Leu-Arg-7-amino-4-methyl coumarin (Z-Val-Leu-Arg-AMC) was from Anaspec (Eurogentec, Angers, France). Pepstatin A, EDTA, AEBSF (Pefabloc), and MMTS were from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). N-(L-3-trans-Propylcarbamoyloxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline (CA-074) was from Calbiochem (VWR International S.A.S., France). Morpholinourea-leucinyl-homophenylalanine-vinyl-sulfone phenyl inhibitor (LHVS) was a kind gift from Dr. J. H. McKerrow (University of California, San Diego, La Jolla, CA, USA).

Ethic statement: This study was conducted in accordance with the ethical standards set out in the Helsinki Declaration and the local French bioethical committee of the CHRU Tours, Hôpital Bretonneau with the approval No. DC-2008-308, and informed consent was obtained for each subject.

Human lung tissues: Resected lung samples were obtained from seventy-two patients who underwent surgery for primary lung cancer at the Trousseau Hospital (Tours, France) between 2006 and 2011, as previously described elsewhere [17]. The pathological findings of pulmonary nodule were non-small cell lung cancer. Clinical characteristics of these patients are described in **Table 1**. Patients were divided into different groups based on smoking status (non-smoker: NS, current smoker: CS and former smoker: FS) and the presence or absence of COPD. A diagnosis of COPD was made by the physician based on smoking history (>20 pack-years) and forced expiratory volume in 1 s versus forced vital capacity (FEV₁/FVC)

ratio of <0.7, using spirometric tests. According to the Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) staging, we reported 17 patients as GOLD stage I, 18 as GOLD stage II and 7 as GOLD stage III. Smoking history was calculated in pack-years, defined as the number of pack of cigarettes smoked per day multiplied by the number of years the person has smoked. Non-tumor tissues were harvested at least at 3 cm from the tumor. Samples were then frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Tissue samples were embedded in Tissue-Tek OCT (Sakura Finetek Europe, Alphen aan den Rijn, The Netherlands), and 15 mg were cut on a cryotome (tissue section: 4 µm) (Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Tissue sections were incubated in PBS or in a lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 10% glycerol, 1% NP40, 2 mM EDTA, 137 mM NaCl) containing 200 mM sodium orthovanadate, a phosphatase inhibitor, and a cocktail of proteases inhibitors (10.4 mM AEBSF, 0.8 µM aprotinin, 40 µM bestatin, 140 µM E-64, 20 µM leupeptine, 15 µM pepstatine A). Incubation was made for 45 min at 4°C under agitation and then samples were centrifuged (21000 x g) at 4°C for 20 min. Supernatant were harvested and frozen at -80°C until required. Protein quantification in supernatants was assessed with bicinchoninic acid assays (BCA protein assay kit, Interchim, Montluçon, France).

Induced human sputa: Sputum from stable COPD and exacerbated COPD smokers were collected at the Bretonneau Hospital of Tours (Service de Pneumologie, CHRU, Tours). This study was approved by the French bioethical authorities (n° CPP: 2012-R21) and informed written consent was obtained from each participant. Samples were collected after a first administration of 0.9% sterile saline solution for 10 min and an additional 10 min administration of 4% sterile saline solution with an ultrasonic nebulizer. A single administration of 4% sterile saline solution for 20 min was realized for patients whose FEV₁ was more than 70%. Each sample was resuspended in PBS (3 mL for 1 g sputum) containing 5mM DTT, agitated for 15 min at 4°C and centrifuged at 800 x g for 10 min at 4°C. Cell pellets were centrifuged at 10 000 x g for 10 min at 4°C and soluble fraction was harvested, aliquoted and frozen at -80°C until required. Protein quantification was assessed with bicinchoninic acid assays.

Western-blot: Goat polyclonal anti-human cathepsins B, L, and S, mouse monoclonal anti-human cystatin C, and goat polyclonal anti-human stefin B were from R&D System. Mouse monoclonal anti-human cathepsin K and rabbit polyclonal anti-human catalase were from Calbiochem. Rabbit polyclonal anti-human cathepsin H was supplied by Fitzgerald

(Interchim). Mouse monoclonal anti- β -actin came from Sigma-Aldrich. Rabbit polyclonal anti-LL-37 was purchased from Innovagen (Lund, Sweden). For each group, tissue cell free lysates were pooled together prior analysis. Pools of tissue cell free lysates and sputum from COPD and control patients (standardized amount: 30 μ g protein / samples) were diluted in Laemmli buffer under reducing conditions and boiled for 5 min. Samples were loaded onto a 15% SDS-PAGE for detection of cathepsins B, H, L and S and stefin B, and on 16% SDS-PAGE for detection of LL-37/hCAP-18. Gels were electroblotted onto nitrocellulose membranes (Hybond-ECL, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Membranes were incubated under agitation overnight at 4°C with anti-human cathepsins B, H, L, K and S, and anti-human stefins A and B (1:1000 in PBS, 0.1% Tween 20, 5% powdered milk) then incubated with secondary IgG-horseradish peroxidase conjugate (1:5000) for 1 h at room temperature prior to the detection using the ECL Plus Western Blotting Detection system (Amersham Biosciences). The same protocol was used for the anti-human cystatin C (1:500) and anti-LL-37 (1:10000) antibodies. Protein load was assessed using anti- β -actin antibody (1:2000). Densitometric analysis was carried out using the ImageJ software (NIH, Bethesda, MD, USA). Data from tissue samples were normalized to β -actin signal while data from sputa were normalized to the weight of loaded sputum. Assays were repeated at least at three times.

Evaluation of total antioxidant and oxidant status and determination of oxidative stress index:

Total antioxidant status (TAS) and total oxidant status (TOS) levels in human lung tissue and bronchial epithelial cell (pHBec) lysates were measured using colorimetric assay kits (Rel Assay Diagnostics; Mega Tip, Gaziantep, Turkey). The assay characteristics are described elsewhere [18,19]. TAS and TOS measurements were performed using Versamax Microplate Reader (Molecular Devices, St Grégoire, France) according to the instructions of the manufacturer. Briefly, TAS method depends on the ability of antioxidants present in sample to inhibit ABTS^+ radical formation from the oxidation of ABTS (2, 2'-azino-di-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) by metmyoglobin and hydrogen peroxide. After 10 min incubation with the chromogen at 37 °C, the amount of ABTS^+ formation is measured at 660 nm. The assay is calibrated with a standard stable antioxidant solution of known concentration, referred to as Trolox equivalent (6-hydroxy-2, 5, 7, 8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid), a water soluble vitamin E analog. Values of TAS are expressed as μ mol Trolox equivalent/Liter (μ mol Trolox eq./L). TOS method is related to the total amount of oxidant molecules present in the sample and consists to measure oxidants that oxidized the ferrous

ion-chelator complex to ferric ions, which make a colored complex with xylenol orange in an acidic medium (Abs = 530 nm). TOS assay is calibrated with hydrogen peroxide (H₂O₂) and the results were expressed in $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ eq./L}$.

Active site labeling of cysteine cathepsins with biotinylated cystatin derived probe: The Biot-(PEG)₂-Ahx-LeuValGly-DMK probe was synthesized and prepared as previously described [20]. Pools of tissue cell free lysates (30 μg of total protein) were diluted in 100 mM sodium acetate, pH 5.5, 1 mM AEBSF, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.01% Brij35 and incubated with Biot-(PEG)₂-Ahx-LeuVal-Gly-DMK (50 nM) for 1 h at 30°C. Control was prepared with recombinant cathepsin S pre-incubated or not with E-64 (10 μM). Alternatively, pool of non-COPD CS lysates (30 μg of total protein) was also pre-treated with E-64 (100 μM) before adding the biotinylated probe. Samples were then separated on a 15% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane. Detection was made with HRP-Extravidin[®] (Sigma-Aldrich, 1:4000 in PBS 1% BSA, 0.1% Tween20).

Preparation of aqueous cigarette smoke extract (CSE): CSE was prepared using a protocol modified from [21]. Mainstream smoke of three Research-grade cigarettes (3R4F) with filter (Kentucky Tobacco Research and Development Center at the University of Kentucky, Lexington, KY) was bubbled in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 (50 mL) or in 100 mM HEPES buffer, pH 7.4 in a closed environment. The average burning time per cigarettes was about 8 min. The obtained solution was considered as 100% CSE and was aliquoted and stored at -80°C until required. Cigarette smoke extract preparation was standardized by measuring the absorbance at a wavelength of 320 nm (corresponding to the absorbance of polycyclic compounds, e.g. quinic acid or nicotine) with a Cary 100 UV visible spectrophotometer (Agilent Technologies, Courtaboeuf, France). Alternatively, 100% CSE designed for cell culture was generated in BEBM media (Lonza, Worthingham, UK) and sterile-filtered through a 0.2 μm filter.

Oxidative potential of CSE: The oxidant potential of CSE was measured by its ability to convert non-fluorescent dihydrorhodamine-123 to oxidized fluorescent rhodamine-123 (Sigma-Aldrich). Briefly, CSE (0 to 40%) was incubated in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5 or in 100 mM HEPES buffer, pH 7.4 with dihydrorhodamine-123 (50 μM , final volume 320 μL) for 1 h at room temperature and protected from light. Fluorescence was

measured using a Cary eclipse spectrofluorimeter (Agilent Technologies, France, excitation wavelength: 490 nm, emission wavelength: 530 nm). The concentration of generated rhodamine-123 was determined using a calibration curve of rhodamine-123 (0 to 200 nM).

Culture of pHBEs: Normal primary human bronchial epithelial cells (pHBEs, Lonza) were cultured at passage 2 in 21cm² dishes at a density of 8000 cells/cm² in BEGM medium (Lonza) and let grow until confluency (7 days). Cells were treated with 0%, 2.5%, 5%, 10%, or 20% CSE for 2 h and 24 h in a total amount of 5 mL media. Culture media were then harvested and treated immediately with 100 mM sodium acetate, pH 5.0, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM EDTA, 40 μ M pepstatin A, and 1 mM MMTS (conservative buffer). Cell debris were removed after centrifugation (1000 x g, 8 min, 4°C) and the supernatant was concentrated using Vivaspin 4 concentrators (Sartorius, Dourdan, France) before stored at -80°C until analysis. Alternatively, plated cells were washed twice with ice-cold PBS and scraped in 250 μ L of the conservative buffer. Total cell extracts were obtained by a series of three freeze/thaw cycles. Lysate was centrifuged at 5000 x g at 4 °C for 10 min. Supernatants were collected and frozen at -80°C. Quantification of protein in supernatants and lysate samples was assessed by Bradford assay (Biorad). Measurement of the overall cathepsin activity was performed using Z-Phe-Arg-AMC (50 μ M) in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, 5 mM DTT, and 0.01% Brij35. Cathepsin S activity was carried out using Z-Val-Leu-Arg-AMC (50 μ M) in 100 mM HEPES buffer, pH 7.4, 5 mM DTT, and 0.01% Brij35. Cell lysates were subjected to 15% SDS-PAGE under reducing conditions and then immunoblotted as described above using an anti-cathepsin S, anti-stefin B and anti-catalase polyclonal antibodies. Densitometric analysis was carried out using the ImageJ software (NIH).

Cytotoxicity assays: The viability of CSE treated cells was assessed by MTT assay on 1.10^4 cells/cm² seeded on 24 wells plates. After 2 h of CSE treatment (0-20%), thiazolyl-blue-tetrazolium-bromide (Sigma-Aldrich) was added to each well (final concentration 0.5 mg/mL) and incubated 1 h at 37°C. Supernatants were harvested and diluted in isopropanol, 0.1% Triton X-100 to dissolve formazan crystals. Absorbance was measured at 570 nm with a microplate reader (Tecan; Männedorf, Switzerland). Alternatively activity of released lactate dehydrogenase (LDH) was assessed with the cytotoxicity detection kit (LDH) (Roche, Mannheim, Germany) following manufacturer's instructions.

Hydrolysis of LL-37: Synthetic LL-37 (20 ng, GeneCust Europe, Dudelange, Luxembourg,) was incubated with stable COPD and exacerbated COPD sputum (1–24 h) at 37 °C in PBS, pH 7.4, 5 mM DTT, 0.01% Brij35, 1 mM AEBSF, 1 mM EDTA (final volume: 20 µL; 5 µg of protein). In parallel, LL-37 (20 ng) was incubated with cell free lysate from pHBECs, treated or not with 10% CSE, in 100 mM sodium acetate buffer pH 5.5 for 0-24 h at 37°C (final volume 20 µL, 0.2 µg of protein). LL-37 was incubated with pre-activated cathepsin S (5 nM, substrate:enzyme molar ratio 1:4500) in the presence or absence of increasing concentrations of CSE (0 to 20%) for 30 min in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, 0.01% Brij35, containing DTT (0 to 5 mM) at 37°C. Samples were then diluted with Laemmli buffer to stop reaction and boiled for 3 min. Controls were performed in the presence of E-64 (10 µM) or LHVS (100 nM). Samples were subjected to 16% SDS-PAGE under reducing conditions and then immunoblotted as described above using an anti-LL-37 antibody.

Maturation of procathepsin S: Processing of procathepsin S (1 µg) was conducted in 100 mM sodium acetate buffer pH 4.0, 15 µM DTT, 0.01% Brij35 in the presence or absence of CSE (0 to 40%) for 5 h at 26 °C. Samples were then diluted in Laemmli buffer and subjected to a 15% SDS-PAGE under reducing conditions. Gels were stained with Coomassie Brilliant blue G-250.

Inactivation of cathepsin S by CSE: The activity of human cathepsin S (1 nM) was measured at 37°C in the presence or absence of CSE (0 to 40%) in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, 0.01% Brij35, 15 µM DTT using Z-Leu-Arg-AMC (20 µM) as a substrate. Assays were performed with cathepsins B, K and L (1 nM) using Z-Phe-Arg-AMC (20 µM). Experiments were performed in 96-well microtitration plates (Nunc, microtiter plates, ThermoFisher Scientific, France) and fluorescence release was monitored using a Spectramax Gemini spectrofluorimeter (Molecular Devices, wavelengths of 350 nm for excitation and of 460 nm for emission). The substrate consumption was less than 5%. Alternatively, the activity of cathepsin S (1 nM) was monitored at 37°C in the presence or absence of CSE (0 to 40%) or H₂O₂ (0 to 1mM) in 100 mM HEPES buffer, pH 7.4, 0.01% Brij35, 15 µM DTT using Z-Leu-Arg-AMC (20µM) as a substrate. The first order inactivation constants k_{obs} were calculated with Enzfitter software (Biosoft, Cambridge, UK). All kinetic measurements were performed in duplicate or triplicate and repeated twice.

Statistical analysis: Data were expressed as the mean of percentage or absolute value standard $\pm$ standard deviation (SD) of n experiments. Statistical analysis of results was carried out by nonparametric Mann-Whitney U test and groups comparison were realized with non-parametric Kruskal-Wallis test. A p -value < 0.05 was considered significant.

Results and discussion

Clinical data

Seventy-two patients (56 men and 16 women) aged 63.2 ± 10.2 years were enrolled for the study. Forty-two subjects were diagnosed with COPD and were divided into three groups according to the Global initiative for chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) classification (stage I, n=17, stage II, n=18 and stage III, n=7). Their clinical characteristics are reported in **Table 1**. COPD patients showed lung functional alterations, including lower forced expiratory volume in one sec (FEV₁) (% predicted), which differs significantly between the three COPD groups, but not between current (CS) and former smokers (FS), except for GOLD III. Current and former smokers, with or without COPD, were similar with regard to age and sex, and had similar smoking frequency.

Lung cathepsins B, L and S expression is stimulated by active smoking

The expression of human cathepsins B, H, L and S was investigated by Western blot analyses of lung tissue lysates from non-smoker donors (NS, n=10), current (CS, n=10) and former smokers (FS, n=10), and current and former smokers (n=42) with different stages of COPD severities (GOLD I-III) (**Figure 1**). In order to prevent any bias associated with individual clinical specimen, 30 µg of protein pooled from equal amounts of samples from each tissue group, was deposited for gel electrophoresis. Current non-COPD smokers displayed a significant increase of immunoreactive mature Cat B, H, L and S levels compared with the lung of non-smokers. The levels of cathepsins B, L and S in current smokers were ~1.5-fold elevated compared with former smokers. No significant differences were observed between the different groups of smokers (with or without COPD) regarding Cat H expression, suggesting that Cat H is constitutively expressed in lungs and relatively unaffected, at least in part, by the severity of the COPD compared with other related cathepsins. In parallel, a marked increase of Cat B, L and S levels was observed in current smokers with COPD compared with former COPD smokers, supporting that active smoking stimulates Cat B, L and S protein expression, and these findings were independent of the number of pack-years. Conversely, no significant change of stefin B protein expression (a specific endogenous cathepsin inhibitor) was observed between the different groups of current smokers with COPD, suggesting an imbalance between cysteine cathepsins and their inhibitors in favor to proteolysis (data not shown), as reported in other inflammatory lung diseases, including cystic fibrosis, silicosis or sarcoidosis [22–24]. In particular, Cat S expression showed a several-fold higher increase in current smokers with or without COPD (3-5-fold) compared with non-

smokers ($p<0.01$). This difference of Cat S expression in comparison to the ubiquitous Cat B and L strengthens the specific role of tissue-restricted Cat S in lung inflammatory diseases [7]. To be noticed, Western blot analyses corroborate previous immunohistochemical results that demonstrated the elevated Cat S response in lung tissues from current smokers vs former and non-smokers [8]. Conversely, we observed a lower Cat S staining in former COPD smokers compared with current COPD smokers and Cat S levels were decreased in GOLD III vs GOLD I and II, as well as observed for Cat B and L. However, these observations must be viewed with caution due to the limited number of patients in each GOLD category. Nevertheless, lung Cat B, L and S expression in COPD may be regulated by many factors in the surrounding microenvironment, including pH, inflammatory mediators, and oxidative stress. In an attempt to get a clue of the variation of Cat S expression in CS and FS with COPD, we measured the levels of type I cytokine IFN- γ , which is known to be involved in emphysema and alterations in protease and antiprotease balance in pulmonary tissues [10]. Despite IFN- γ levels were increased in CS and FS without COPD vs non-smokers, we did not observed correlation between IFN- γ and Cat S protein expression in COPD patients (data not shown). Interestingly, Liuzzo and colleagues demonstrated that 24 h treatment with IFN- γ dramatically reduced the levels of Cat S protein expression in human macrophages [25], consistent with the observed decrease of Cat S expression in former smokers with severe COPD (GOLD III). Another hypothesis is that type 2 cytokines such as IL-13 may also regulate lung Cat S expression in some COPD individuals [11]. Thus, COPD, in these patients could be a mixed of type I and type II lymphocytes T helper (Th1/Th2) that mediate different cytokine responses. Additional experiments will be required to define candidate mediators of Cat S response as well as those of Cat B and L at the different stages of COPD severity.

Oxidative state and cathepsins activity in lung tissues

There is evidence of increased oxidative stress-mediated by cigarette smoke in the airways of patients with COPD [26]. Total oxidant status (TOS) and total antioxidant status (TAS) were measured in each human lung tissue lysates. While median oxidant levels are elevated in the different groups ($>215 \mu\text{M H}_2\text{O}_2 \text{ eq./L}$), no significant differences were observed between COPD (CS and FS) and non-COPD smokers (CS and FS). Surprisingly, TOS levels of smokers were lower compare with non-smokers. One possible reason for the lack of a significant increase of TOS in COPD may be related to the limitation of the test used in this study, which measures the levels of ferric ions (Fe^{3+}) generated by oxidation of ferrous ions

(Fe²⁺). Because of high reactivity, ferrous iron is bound to compounds such as ceruloplasmin and ferritin, and ferric ions binds to transferrin [27,28]. Lung ferritin and transferrin expression are increased in smokers with or without COPD [29] resulting in higher iron sequestration capacity and could explain why we observed lower chromogen formation in smokers and COPD samples. In contrast, median antioxidant levels (TAS) were lower in smokers groups, except for non-COPD former smokers, than non-smokers. TAS levels were significantly lower in current smokers (non-COPD and COPD, GOLD II, $p<0.05$) than in non-smokers subjects. In former smokers with COPD, there was a trend toward decreased in antioxidant status compared with non-smokers and these findings are compatible with the work of [30]. Levels of catalase (**Figure 1A**), an antioxidant enzyme, which expression remained unaffected in smokers with or without COPD and non-smokers, as reported elsewhere [31]. Additional studies are required to investigate the levels of other antioxidants in lung tissues, such as superoxide dismutase (SOD), which activity in blood is significantly lower in smokers and COPD subjects than in non-smoker subjects [30]. Interestingly, despite their sensitivity to oxidative stress, several thiol-cathepsins were efficiently labeled in lung tissues of smokers, using a selective biotinylated cathepsin inhibitor (i.e. Biot-(PEG)₂-Ahx-LeuValGly-DMK), which specifically targets the nucleophilic active site thiol [20]. Moreover labeling was impaired by E-64 (a broad inhibitor of cathepsins), supporting that cathepsins, including Cat S, partially retain their enzymatic activity in an oxidative environment.

Cat S activity in induced sputum of COPD patients

Next, we investigated whether active Cat S is present in induced sputum from eight subjects with COPD (stable and exacerbated). Results obtained from immunoblot densitometry showed mature Cat S was significantly ~4 times higher in exacerbated patients than stable one (**Figure 2**). The full and/or partly processed proforms of Cat S were also detected. As exacerbation phases correspond to an amplification of the inflammatory response, and which may be triggered by environmental pathogens, levels of antimicrobial peptides (AMPs), such as lactoferrin, β -defensins-2 and -3, SLPI, and LL-37 are increased in the airways of stable COPD patients (for review: [3]). Immunoreactive LL-37 was mostly in its proform, i.e. cathelicidin hCAP-18, which was intensively stained in sputa of COPD patients, with a ~5-fold increase in exacerbated *vs* stable subjects. A previous study reported an increased level of LL-37 measured by ELISA in induced sputum from COPD patients [32]. This apparent discrepancy may be due to cross-reactivity of the anti-LL-37 polyclonal antibody

with both precursor and mature form of LL-37. We previously demonstrated that Cat S is capable of cleaving and inactivating readily LL-37 [15]. We thus incubated synthetic LL-37 with COPD sputum at 37 °C for 6 and 24 h. LL-37 was fully degraded after 24 h incubation in exacerbated sputum but not in stable sample and the hydrolysis was blocked in the presence of specific Cat S inhibitor (LHVS). This result supports the role of Cat S in the regulation of innate immunity during inflammatory lung diseases including cystic fibrosis and COPD, by degrading specific AMPs.

Cigarette smoke extract (CSE) up-regulates Cat S expression and activity in pHBECS

Numerous reports indicated that Cat S has a restricted tissue distribution with a major expression in antigen presenting cells, but also in airway epithelial cells [7,33]. Studies were next undertaken to determine whether CSE regulates the production of Cat S in primary human bronchial epithelial cells (pHBECS). To determine if Cat S is up-regulated, cells were exposed to 0-20% CSE for 2 h, and lysate samples were labeled with anti-Cat S antibody (**Figure 3A**). Cells exposed to CSE (2.5-20%) did not present signs of over toxicity or increased morbidity compared to mock cells. After 2 h of CSE exposure, we observed a significant dose-dependent increase of mature Cat S vs mocked treated cells (**Figure 3B**). This finding was fully supportive of the current smokers lung tissues results and indicated that acute cigarette smoke exposure stimulates Cat S expression in lung epithelial cells *in vitro* and *ex vivo*. Meanwhile, Cat B and L levels were significantly increased following 2 h-treatment with CSE in a dose-dependent manner (data not shown). In parallel, CSE exposure increases gradually the endopeptidase activity of cysteine cathepsins from cell-free lysates, in a dose dependent manner ($r^2 = 0.81$) (**Figure 3C**), which was blocked by E-64 (data not shown). Active-site titration of endopeptidase cysteine cathepsins with E-64 was significantly higher in 20% CSE-exposed cells (32.8 ± 4.2 nmol/mg of protein) compared with mock treated cells (22.0 ± 3.6 nmol/mg of protein) ($p < 0.01$). Moreover, CSE induced a significant increase of catalase levels vs controls. Conversely, stefin B staining was markedly reduced after 10% CSE exposure, supporting an imbalance between cathepsins and their endogenous inhibitors in favor to proteolysis under oxidative stress.

We chose next, 2 h-treatment with 10% CSE to evaluate the peptidase and proteolytic activities of Cat S in pHBECS. The significant induction of active Cat S following 10% CSE exposure resulted in a more efficient degradation of LL-37, after 6 h and 24 h incubation (Fig. 3D) compared with mocked cells. LL-37 hydrolysis was prevented by E-64 and LHVS, supporting that Cat S cleaves specifically LL-37, as demonstrated previously [15]. These

results support that Cat S likely contributes with other proteases to the pathogenesis of COPD by several mechanisms including the hydrolysis of major constituents of innate immunity.

Time- and dose-dependent inactivation of Cat S by CSE

Oxidative stress plays a key role in COPD pathogenesis and cigarette smoke, which contains a high concentration of reactive oxidants, contributes largely. Cysteine cathepsins possess in their active site a nucleophilic cysteine 25 (papain numbering) that is highly susceptible to redox modification [34]. Nevertheless, active Cat S is found in lung tissues and sputa from COPD patients in spite of an unfavorable oxidizing environment. To tentatively understand these apparently contrasting observations, we investigated the regulation of Cat S activity in the presence of CSE.

First, to standardize and quantify the magnitude of oxidative stress induced by CSE, we measured the absorbance of the solutions at 320 nm and their ability to convert dihydrorhodamine-123 to rhodamine-123 [35] (**Figure 4A, B**). Next, fluorimetric assays were used to evaluate the kinetics of Cat S in the presence of CSE. Initially, the enzyme activity was performed with a low concentration of reducing agent DTT (15 μ M), and measured using the fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-AMC, at pH 5.5 and 7.4. CSE inactivated Cat S in a time- and concentration-dependent manner. The inactivation of Cat S is less pronounced at pH 7.4, likely due to the decrease of CSE potential to induce oxidative stress at neutral pH (Fig 4C). The pseudo-first order rate constant (k_{obs}) for inactivation of Cat S by CSE (2.5-20%) was determined at pH 5.5, and compared with those of Cat B, L and K (Fig. 4D). The observed inactivation rate constant was independent of the enzyme concentration in our experimental conditions, indicating that autolysis was not responsible for the loss of activity. The k_{obs} value for all cathepsins increases almost linearly with CSE percentages, Cat S being more resistant to oxidation. Moreover, after 1 h incubation with 10% CSE, Cat S activity was restored approximately 2- and 4-fold following addition of DTT (final concentration 2 mM) at pH 5.5 and 7.4, respectively (Fig. 4E). In line with these results, LL-37 hydrolysis by Cat S was impaired by CSE in a dose dependent manner, but was restored in the presence of increasing concentrations of DTT (0.5-5 mM) (Fig. 4F). In addition, as Cat S is synthesized as inactive precursor (~37 kDa) that can be converted into its mature form by autocatalysis, we studied the effect of CSE on proCat S maturation. As shown in Fig. 4 G, processing of proCat S under acidic conditions during 5 h was not impaired by CSE (2.5-40%), suggesting that the quiescent proform of Cat S found in sputa of COPD patients may correspond to an activable proteolytic reservoir during exacerbation episodes.

In conclusion, Cat S levels are elevated in lung tissue of smokers with or without COPD compared with non-smokers and its expression is related to smoking status. Our experiments indicate that, despite the oxidative stress induced by cigarette smoke, Cat S remains active in lung tissue of COPD smokers and its expression is positively correlated with acute exacerbation. To our knowledge, this is the first study that reports the presence of proteolytically active Cat S in lung tissue from COPD patients. These results are in agreement with major previous studies demonstrating that inflammatory cells such as neutrophils, lymphocytes and macrophages, a major source of cysteine cathepsins, are increased in small and large airways of patients with COPD. In addition to causing lung cancer, stroke and cardiac arrest, cigarette smoke is a major risk factor for the development of COPD [36,37]. Establishing a link between smoking and the induction of Cat S in inflammatory lungs is an important step in understanding the pathology of COPD. Furthermore, the pathogenesis of this chronic lung disease is associated with an infiltration of inflammatory cells and a protease-antiprotease imbalance in favor to proteolysis, contributing in part to emphysema [38]. In another hand, individuals with COPD have increasing susceptibility to lung infections, resulting in exacerbation episodes [2]. Growing evidences indicate that host defense of COPD patients is altered in a smoking-dependent manner [39,40]. Cat S is a key mediator in emphysema by cleaving major components of ECM and BM (i.e. collagens, laminins, elastins, and nidogens), and also in innate immunity through the degradation and inactivation of crucial AMPs (β -defensins -2, -3, SP-A, SLPI, and LL-37) [3]. Here, we demonstrated that the time- and dose-dependent inactivation of Cat S by CSE was more resistant to inactivation in comparison to related Cat B, L and K and this inactivation was partially reversible under reducing conditions. Furthermore, processing of procathepsin S was not impaired by CSE, neither by high concentrations of hydrogen peroxide ($<400\ \mu\text{M}$), a major volatile factor in cigarette smoke (personal observations). Together, these results support that Cat S remains temporarily active under oxidative stress. Finally, exposure to cigarette smoke may be harmful not only to lung tissue integrity but also host respiratory defenses through the production of uncontrolled and deleterious Cat S in COPD. Additional investigations of the roles of Cat S in the pathogenesis of COPD and other pulmonary disorders like cystic fibrosis, particularly where lung oxidative stress may be important, and the utility of selective and specific Cat S inhibitors development in their treatment are a challenging issue.

Acknowledgment

We are grateful to Dr A. Barascu (present address: Université Pierre et Marie Curie, Paris, France) and Dr F. Gueugnon whom both handled lung tissue samples, Dr A. Guillon for providing human sputa and Dr T. Baranek for anti-IFN- γ antibody (Inserm UMR 1100, Tours, France). Mu-Leu-Hph-VSPH (cathepsin S inhibitor) was kindly provided by Dr J. H. McKerrow (University of California, San Diego, La Jolla, CA, USA). This work was supported by institutional funding from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM). P-M. A. was a recipient of a doctoral grant from INSERM-Région Centre-Val de Loire.

References

- [1] R.A. Pauwels, A.S. Buist, P.M. Calverley, C.R. Jenkins, S.S. Hurd, GOLD Scientific Committee, Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 163 (2001) 1256–1276.
- [2] A. Churg, M. Cosio, J.L. Wright, Mechanisms of cigarette smoke-induced COPD: insights from animal models, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 294 (2008) L612–631.
- [3] F. Lecaille, G. Lalmanach, P.-M. Andrault, Antimicrobial Proteins and Peptides in Human Lung Diseases: A Friend and Foe Partnership with Host Proteases, *Biochimie.* (2015). DOI : 10.1016/j.biochi.2015.08.014
- [4] M. Fonović, B. Turk, Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation, *Biochim. Biophys. Acta.* 1840 (2014) 2560–2570.
- [5] D. Brömme, S. Wilson, Role of Cysteine Cathepsins in Extracellular Proteolysis, in: W.C. Parks, R.P. Mecham (Eds.), *Extracell. Matrix Degrad.*, Springer Berlin Heidelberg, 2011: pp. 23–51.
- [6] G. Lalmanach, A. Saidi, S. Marchand-Adam, F. Lecaille, M. Kasabova, Cysteine cathepsins and cystatins: from ancillary tasks to prominent status in lung diseases, *Biol. Chem.* 396 (2015).
- [7] S. Weldon, P. McNally, D.F. McAuley, I.K. Oglesby, C.L. Wohlford-Lenane, J.A. Bartlett, C.J. Scott, N.G. McElvaney, C.M. Greene, P.B. McCray, C.C. Taggart, miR-31 dysregulation in cystic fibrosis airways contributes to increased pulmonary cathepsin S production, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190 (2014) 165–174.
- [8] M.-J. Kang, R.J. Homer, A. Gallo, C.G. Lee, K.A. Crothers, S.J. Cho, C. Rochester, H. Cain, G. Chupp, H.J. Yoon, J.A. Elias, 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.* 178 (2007) 1948–1959.
- [9] A.S. Williams, P.R. Eynott, S.-Y. Leung, P. Nath, R. Jupp, G.T. De Sanctis, R. Resnick, I.M. Adcock, K.F. Chung, Role of cathepsin S in ozone-induced airway hyperresponsiveness and inflammation, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 22 (2009) 27–32.
- [10] Z. Wang, T. Zheng, Z. Zhu, R.J. Homer, R.J. Riese, H.A. Chapman, S.D. Shapiro, J.A. Elias, Interferon gamma induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 1587–1600.
- [11] T. Zheng, Z. Zhu, Z. Wang, R.J. Homer, B. Ma, R.J. Riese, H.A. Chapman, S.D. Shapiro, J.A. Elias, Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema, *J. Clin. Invest.* 106 (2000) 1081–1093.
- [12] G. Schwarz, W.-H. Boehncke, M. Braun, C.J. Schröter, T. Burster, T. Flad, D. Dressel, E. Weber, H. Schmid, H. Kalbacher, Cathepsin S activity is detectable in human keratinocytes and is selectively upregulated upon stimulation with interferon-gamma, *J. Invest. Dermatol.* 119 (2002) 44–49.
- [13] P. Geraghty, M.P. Rogan, C.M. Greene, M.L. Brantly, S.J. O'Neill, C.C. Taggart, N.G. McElvaney, Alpha-1-antitrypsin aerosolised augmentation abrogates neutrophil elastase-induced expression of cathepsin B and matrix metalloprotease 2 in vivo and in vitro, *Thorax.* 63 (2008) 621–626.
- [14] E. Fiebiger, P. Meraner, E. Weber, I.F. Fang, G. Stingl, H. Ploegh, D. Maurer, Cytokines regulate proteolysis in major histocompatibility complex class II-dependent antigen presentation by dendritic cells, *J. Exp. Med.* 193 (2001) 881–892.

- [15] P.-M. Andrault, S.A. Samsonov, G. Weber, L. Coquet, K. Nazmi, J.G.M. Bolscher, A.-C. Lalmanach, T. Jouenne, D. Brömme, M.T. Pisabarro, G. Lalmanach, F. Lecaille, Antimicrobial Peptide LL-37 Is Both a Substrate of Cathepsins S and K and a Selective Inhibitor of Cathepsin L, *Biochemistry*. 54 (2015) 2785–2798.
- [16] J. Sage, F. Mallèvre, F. Barbarin-Costes, S.A. Samsonov, J.-P. Gehrcke, M.T. Pisabarro, E. Perrier, S. Schnebert, A. Roget, T. Livache, C. Nizard, G. Lalmanach, F. Lecaille, Binding of Chondroitin 4-Sulfate to Cathepsin S Regulates Its Enzymatic Activity, *Biochemistry*. 52 (2013) 6487–6498.
- [17] F. Gueugnon, A. Barascu, K. Mavridis, A. Petit-Courty, S. Marchand-Adam, V. Gissot, A. Scorilas, S. Guyetant, Y. Courty, Kallikrein-related peptidase 13: an independent indicator of favorable prognosis for patients with nonsmall cell lung cancer, *Tumor Biol*. 36 (2015) 4979–4986.
- [18] O. Erel, A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions, *Clin. Biochem*. 37 (2004) 112–119.
- [19] O. Erel, A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status, *Clin. Biochem*. 38 (2005) 1103–1111.
- [20] T. Garenne, A. Saidi, B.F. Gilmore, E. Niemiec, V. Roy, L.A. Agrofoglio, M. Kasabova, F. Lecaille, G. Lalmanach, Active site labeling of cysteine cathepsins by a straightforward diazomethylketone probe derived from the N-terminus of human cystatin C, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2015).
- [21] A.C. Schamberger, N. Mise, J. Jia, E. Genoyer, A.Ö. Yildirim, S. Meiners, O. Eickelberg, Cigarette smoke-induced disruption of bronchial epithelial tight junctions is prevented by transforming growth factor- β , *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 50 (2014) 1040–1052.
- [22] C. Perdereau, E. Godat, M.-C. Maurel, E. Hazouard, E. Diot, G. Lalmanach, Cysteine cathepsins in human silicotic bronchoalveolar lavage fluids, *Biochim. Biophys. Acta*. 1762 (2006) 351–356.
- [23] C. Serveau-Avesque, M.F.-D. Martino, V. Hervé-Grépinet, E. Hazouard, F. Gauthier, E. Diot, G. Lalmanach, Active cathepsins B, H, K, L and S in human inflammatory bronchoalveolar lavage fluids, *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ*. 98 (2006) 15–22.
- [24] C. Naudin, A. Joulin-Giet, G. Couetdic, P. Plésiat, A. Szymanska, E. Gorna, F. Gauthier, F. Kasprzykowski, F. Lecaille, G. Lalmanach, Human Cysteine Cathepsins Are Not Reliable Markers of Infection by *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis, *PLoS ONE*. 6 (2011) e25577.
- [25] J.P. Liuzzo, S.S. Petanceska, D. Moscatelli, L.A. Devi, Inflammatory mediators regulate cathepsin S in macrophages and microglia: A role in attenuating heparan sulfate interactions, *Mol. Med*. 5 (1999) 320–333.
- [26] P.J. Barnes, Mediators of chronic obstructive pulmonary disease, *Pharmacol. Rev*. 56 (2004) 515–548.
- [27] J.J. Moreno, M. Foroozesh, D.F. Church, W.A. Pryor, Release of iron from ferritin by aqueous extracts of cigarette smoke, *Chem. Res. Toxicol*. 5 (1992) 116–123.
- [28] P. Aisen, A. Leibman, J. Zweier, Stoichiometric and site characteristics of the binding of iron to human transferrin, *J. Biol. Chem*. 253 (1978) 1930–1937.
- [29] Q. Philpott, G. Deslée, T.L. Adair-Kirk, J.C. Woods, D. Byers, S. Conradi, S. Dury, J.M. Perotin, F. Lebargy, C. Cassan, R. Le Naour, M.J. Holtzman, R.A. Pierce, Increased iron sequestration in alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease, *PloS One*. 9 (2014) e96285.
- [30] H. Tavilani, E. Nadi, J. Karimi, M.T. Goodarzi, Oxidative stress in COPD patients, smokers, and non-smokers, *Respir. Care*. 57 (2012) 2090–2094.

- [31] P. Joppa, D. Petrásová, B. Stancák, Z. Dorková, R. Tkáčová, Oxidative stress in patients with COPD and pulmonary hypertension, *Wien. Klin. Wochenschr.* 119 (2007) 428–434.
- [32] Y.-Y. Jiang, W. Xiao, M.-X. Zhu, Z.-H. Yang, X.-J. Pan, Y. Zhang, C.-C. Sun, Y. Xing, The effect of human antibacterial peptide LL-37 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease, *Respir. Med.* 106 (2012) 1680–1689.
- [33] K. Storm van's Gravesande, M.D. Layne, Q. Ye, L. Le, R.M. Baron, M.A. Perrella, L. Santambrogio, E.S. Silverman, R.J. Riese, IFN regulatory factor-1 regulates IFN-gamma-dependent cathepsin S expression, *J. Immunol.* 168 (2002) 4488–4494.
- [34] N.M. Giles, A.B. Watts, G.I. Giles, F.H. Fry, J.A. Littlechild, C. Jacob, Metal and redox modulation of cysteine protein function, *Chem. Biol.* 10 (2003) 677–693.
- [35] S.K. McMaster, M.J. Paul-Clark, M. Walters, M. Fleet, J. Anandarajah, S. Sriskandan, J.A. Mitchell, Cigarette smoke inhibits macrophage sensing of Gram-negative bacteria and lipopolysaccharide: relative roles of nicotine and oxidant stress, *Br. J. Pharmacol.* 153 (2008) 536–543.
- [36] R. Doll, Uncovering the effects of smoking: historical perspective, *Stat. Methods Med. Res.* 7 (1998) 87–117.
- [37] G.G. Brusselle, G.F. Joos, K.R. Bracke, New insights into the immunology of chronic obstructive pulmonary disease, *Lancet Lond. Engl.* 378 (2011) 1015–1026.
- [38] R.T. Abboud, S. Vimalanathan, Pathogenesis of COPD. Part I. The role of protease-antiprotease imbalance in emphysema, *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 12 (2008) 361–367.
- [39] T.S. Hallstrand, T.L. Hackett, W.A. Altemeier, G. Matute-Bello, P.M. Hansbro, D.A. Knight, Airway epithelial regulation of pulmonary immune homeostasis and inflammation, *Clin. Immunol.* 151 (2014) 1–15.
- [40] D.J. Hassett, M.T. Borchers, R.J. Panos, Chronic obstructive pulmonary disease (COPD): evaluation from clinical, immunological and bacterial pathogenesis perspectives, *J. Microbiol.* 52 (2014) 211–226.

Table 1: Patient characteristics for tissue samples

Smoking status is noted as below: NS, non-smoker; CS, current smoker; FS, former smoker. Data are noted as mean $\pm$ SD

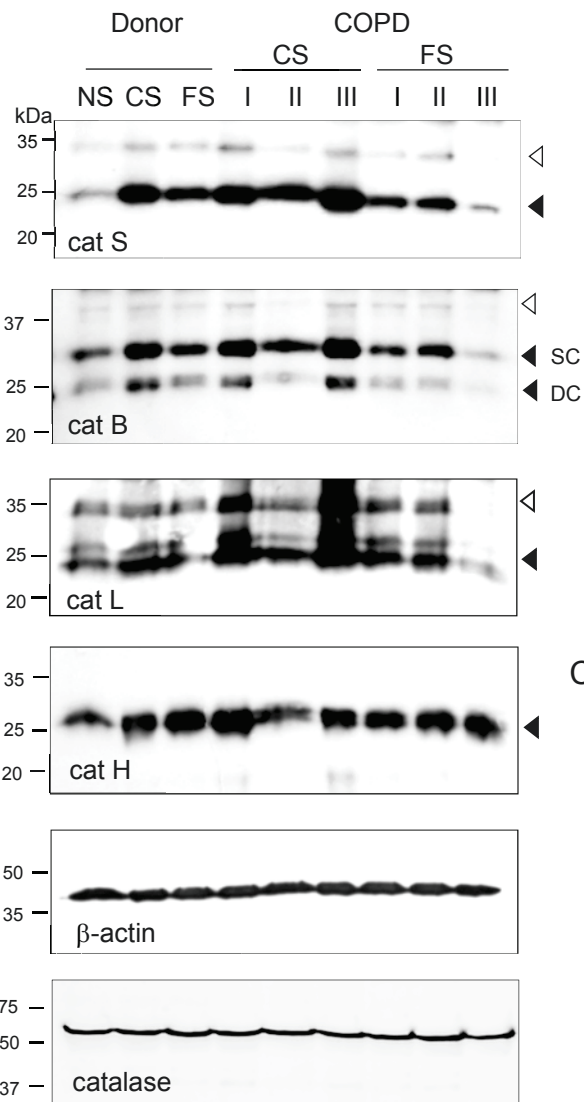
	Donors			COPD					
	NS	CS	FS	GOLD I		GOLD II		GOLD III	
				CS	FS	CS	FS	CS	FS
Smoking status (patients n°)	(n = 10)	(n = 10)	(n = 10)	(n = 7)	(n = 10)	(n = 9)	(n = 9)	(n = 2)	(n = 5)
Sex (M/F)	2/8	9/1	9/1	5/2	9/1	6/3	9/0	2/0	5/0
Age (years)	73 $\pm$ 7	54 $\pm$ 11	62 $\pm$ 9	62 $\pm$ 6	66 $\pm$ 12	60 $\pm$ 9	63 $\pm$ 8	61 $\pm$ 10	68 $\pm$ 5
Smoking frequency (pack-years)	0	28 $\pm$ 13	40 $\pm$ 15	54 $\pm$ 26	32 $\pm$ 15	64 $\pm$ 26	54 $\pm$ 24	49 $\pm$ 24	55 $\pm$ 13
FEV ₁ (% of predicted)	99 $\pm$ 19	92 $\pm$ 19	83 $\pm$ 11	92 $\pm$ 6	99 $\pm$ 14	69 $\pm$ 9	69 $\pm$ 8	34 $\pm$ 3	43 $\pm$ 3

Figure 1: Expression of Cat B, H, L and S in lung tissue from non-smokers, smokers and smokers with COPD

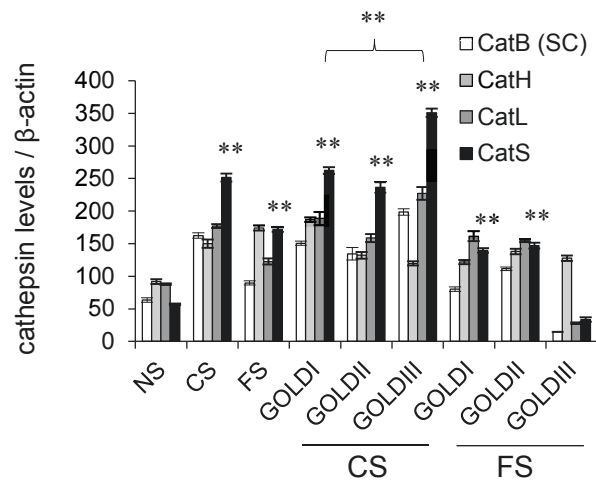
Lungs tissue lysates of patients were divided into different groups; non-smoker (NS), current and former smokers (CS and FS), and COPD smokers (CS and FS) with different stages of severity (GOLD I, mild; GOLD II, moderate; GOLD III, severe). A) 30 µg of protein pooled from equal amounts of samples from each tissue group was separated by 15% SDS-PAGE under reducing conditions. Detection of Cat B (SC: single chain, DC: double chain), H, L and S (white arrow: proform, black arrow: mature form) was carried out by Western Blot analysis using selective polyclonal antibodies. Protein load control was made using anti-β-actin polyclonal antibody. Catalase levels were detected using anti-catalase antibody. Similar results were obtained in three separate experiments. B) Densitometric analysis of Cat B (SC, white bar), Cat H (light grey bar), Cat L (dark grey bar) and Cat S (black bar) staining was performed using the ImageJ software. All expression values were normalised to respective loading control. Data are represented as mean ± SD (n=3). C) Active site labeling of cysteine cathepsins using selective biotinylated probe Biot-(PEG)₂-Ahx-LeuValGly-DMK (50 nM). Assays were performed with recombinant Cat S and Cat S preincubated with E-64 (10 µM). Pool of current non-COPD smokers lysates (30 µg of total protein) was also pretreated with E-64 (100 µM) before adding the biotinylated probe. D) Total oxidant status (TOS) and E) Total antioxidant status (TAS) were measured in tissue samples using Rel Assay Diagnostics[®] kits. Data were normalized with sample protein load. Statistical analysis was performed with the one way Mann–Whitney U test, and values were compared with the control (*: p<0.05, **: p<0.01).

Figure 1

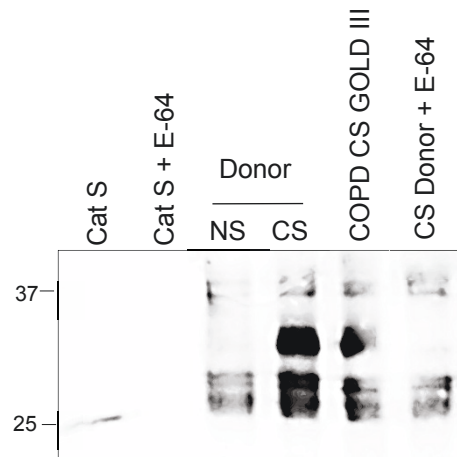
A)



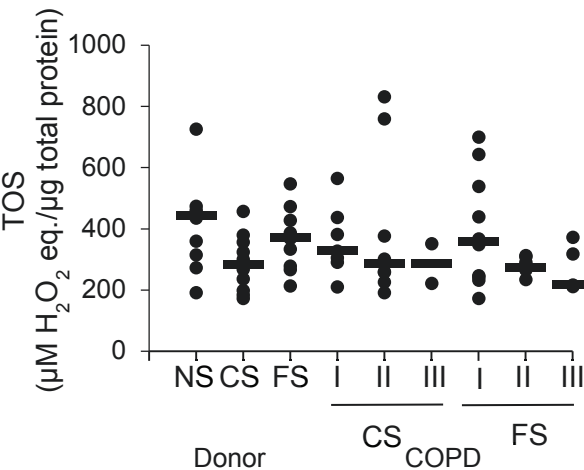
B)



C)



D)



E)

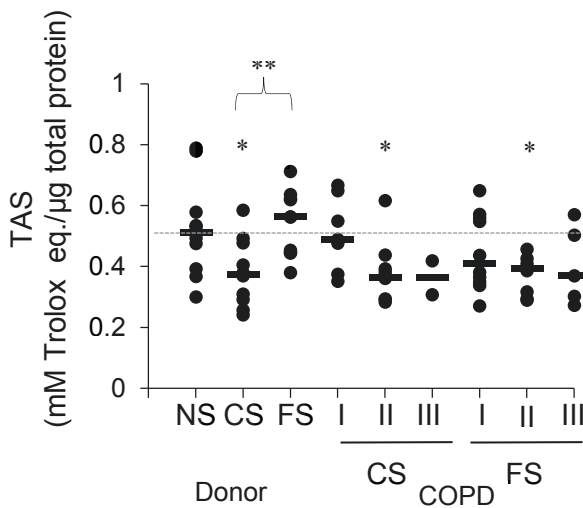


Figure 2: Cat S and hCAP-18/LL-37 status in induced sputa from stable and exacerbated COPD patients

A) Western blot analysis of Cat S in sputa (20 µg total protein) from four stable COPD patients (lanes 1-4) and four exacerbated COPD patients (lanes 5-8). B) Densitometric analysis of mature CatS. C) Western blots analysis of hCAP-18/LL-37 in sputa. D) Densitometric analysis of hCAP-18 band. Values were normalized to the weight of loaded sputum. The evaluation in B and D are representative of at least two similar experiments. Statistical analysis was performed with the two ways Mann–Whitney U test. E) Representative experiment (of n =2) illustrating western blot analysis of LL-37 degradation by Cat S in COPD sputa. LL-37 (20 ng) was incubated with sputum from COPD patients (stable and exacerbated) in PBS buffer pH 7.4, DTT 5 mM, EDTA 1 mM, AEBSF 1 mM, and Brij35 0.01% for 6 and 24 h. Controls were performed with sputum pretreated with E-64 (50 µM) and LHVS (100 nM) before adding LL-37 and incubated 24 h.

Figure 2

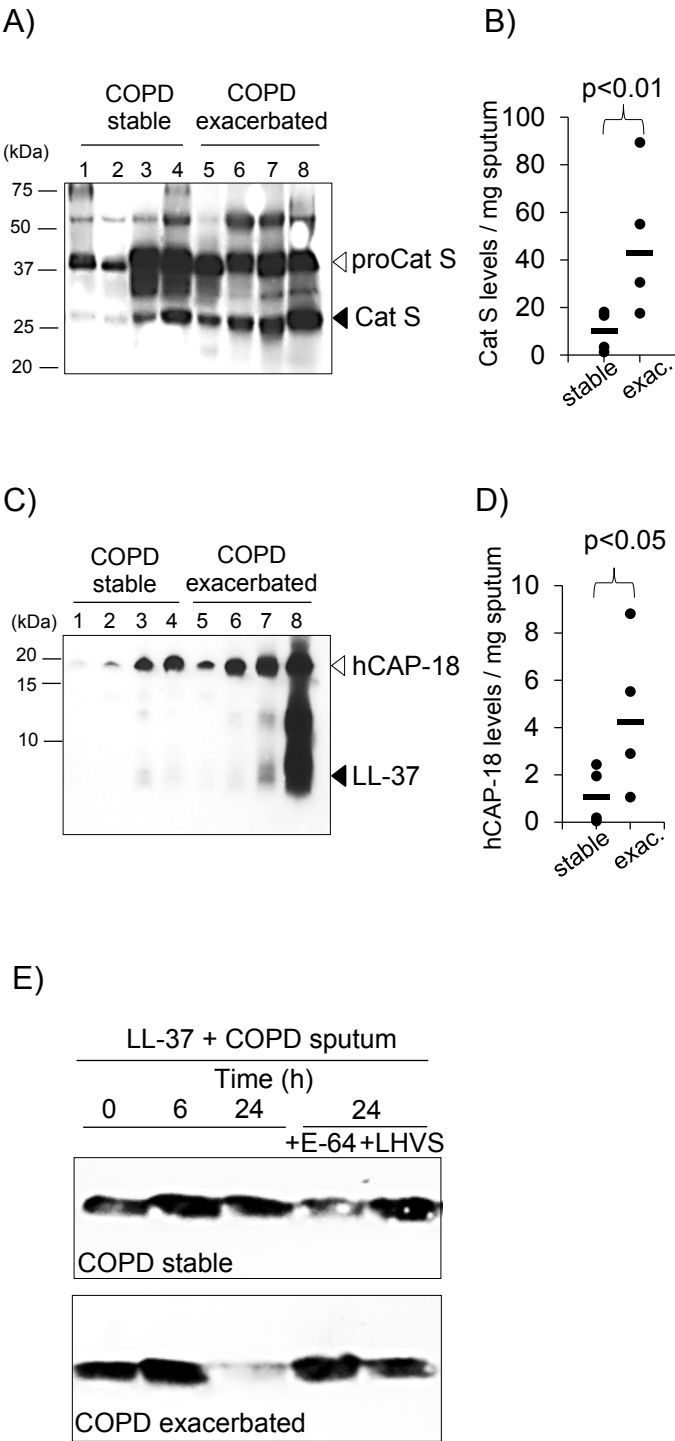
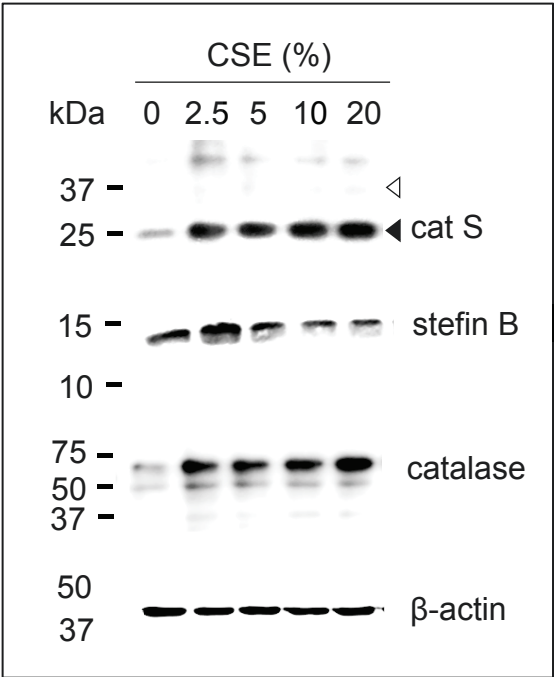


Figure 3: Effect of CSE on Cat S expression and activity in pHBECs

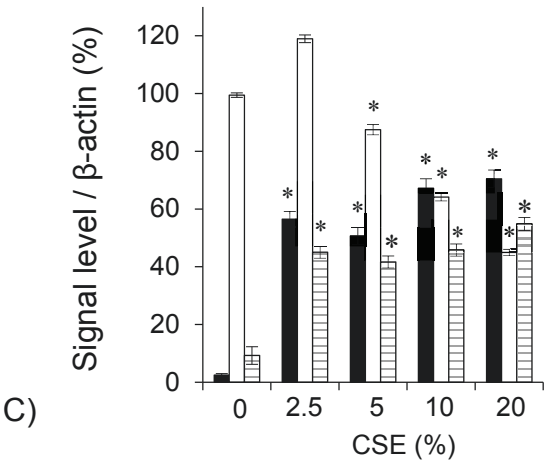
Culture of primary human bronchial epithelial cells (pHBEs) was treated with 0%, 2.5%, 5%, 10%, or 20% CSE for 2 h. A) Cell lysates were subjected to 15% SDS-PAGE (total protein amount: 5 µg/each lane) under reducing conditions and then immunoblotted using an anti-Cat S, anti-stefin B and anti-catalase polyclonal antibodies. B) Densitometric analysis of Cat S (black bar), stefin B (white bar) and catalase (hatched bar). Data are represented as mean $\pm$ SD (n=3). C) Total cathepsins activity from pHBEs lysates (standardized amount of protein: 100 ng) was measured using Z-Phe-Arg-AMC (50 µM) in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, 5 mM DTT, and 0.01% Brij35. D) Western blot of LL-37 hydrolysis. LL-37 (20 ng) was incubated for 0-24 h at 37°C with cell free lysate (total protein amount: 5 µg) treated or not with 10% CSE. Controls were performed with E-64 and LHVS.

Figure 3

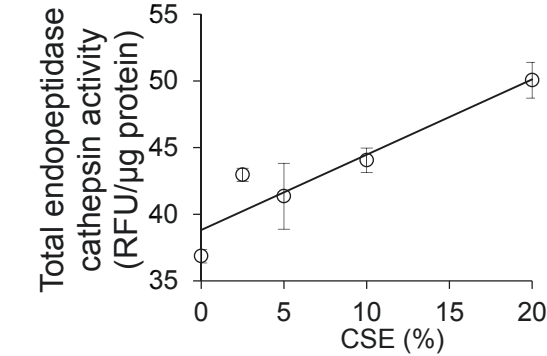
A)



B)



C)



D)

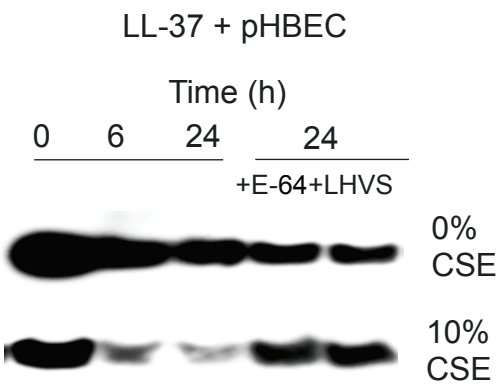
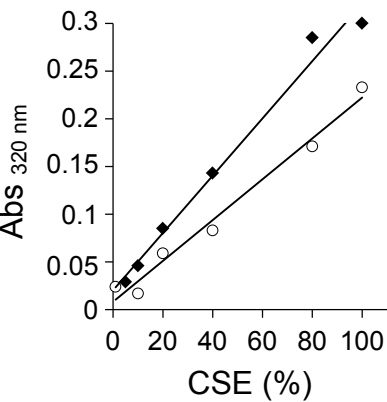


Figure 4: Regulation of Cat S activity by CSE

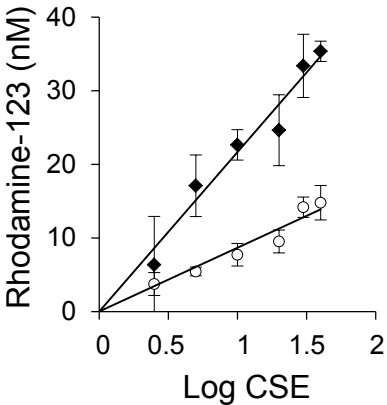
A) Cigarette smoke extract (CSE) preparation was standardized by measuring the absorbance at a wavelength of 320 nm at pH 5.5 (filled black diamond) and 7.4 (empty circle). B) The oxidant potential of each CSE preparation was measured by its ability to convert non-fluorescent dihydrorhodamine-123 to oxidized fluorescent rhodamine-123 (λ_{exc} : 490 nm, λ_{em} : 530 nm) at pH 5.5 (filled black diamond) and 7.4 (empty circle). C) Cat S (1 nM) activity (relative fluorescence unit, RFU) was measured at 37°C in the presence or absence of CSE (2.5-40%) at pH 5.5 and 7.4, using Z-Leu-Arg-AMC (20 μ M) as a substrate. D) The first order inactivation constant k_{obs} of Cat S was calculated at pH 5.5 and compared with that of Cat B, L and K (1 nM). All kinetic measurements were performed in duplicate and repeated twice. E) After 1 h incubation with 10% CSE, Cat S activity was triggered with Z-Leu-Arg-AMC (20 μ M) as a substrate in the presence or absence of DTT (2 mM) at pH 5.5 (black bar) and 7.4 (white bar). Statistical analysis was performed with the two ways Mann–Whitney U test, and values were compared with the control (*: $p < 0.01$). F) Effect of CSE on the degradation of LL-37 by Cat S. LL-37 was incubated with activated Cat S (5 nM, substrate:enzyme molar ratio: 4500) in the presence of CSE (0 to 20%) for 30 min in 100 mM sodium acetate buffer, pH 5.5, 0.01% Brij35, containing DTT (0 to 5 mM) at 37°C. Samples were subjected to a 15% SDS-PAGE under reducing conditions and gels were stained with Coomassie Brilliant blue G-250. G) Effect of CSE on proCat S processing. Processing of proCat S (1 μ g) was performed in 100 mM sodium acetate buffer pH 4.0, 15 μ M DTT, 0.01% Brij35 in the presence of CSE (0 to 40%) for 5 h at 26 °C. Samples were subjected to a 15% SDS-PAGE under reducing conditions and gels were stained with Coomassie Brilliant blue G-250.

Figure 4

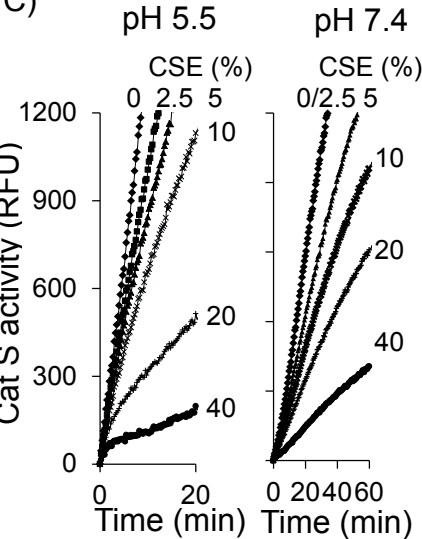
A)



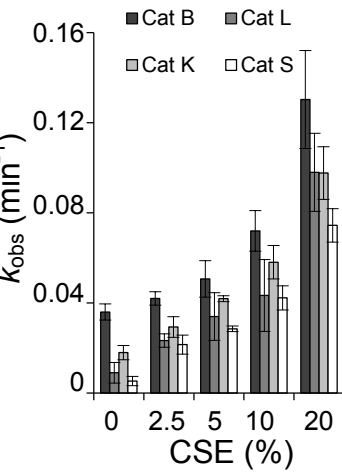
B)



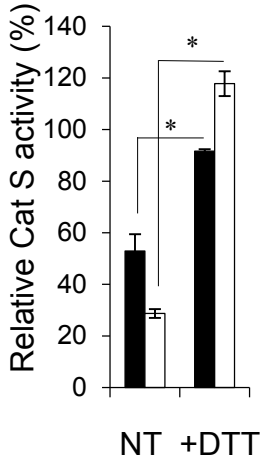
C)



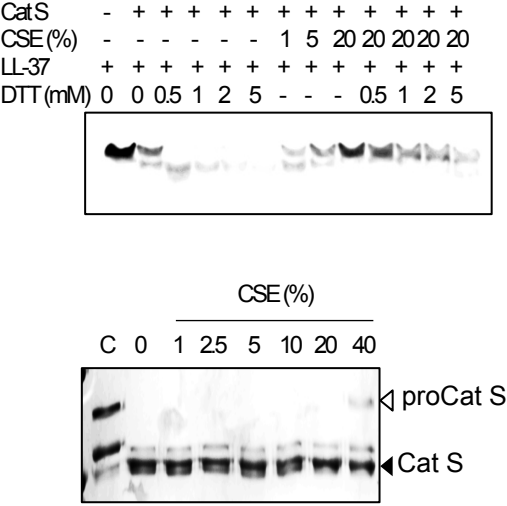
D)



E)



F)



Conclusion générale et perspectives

Les maladies inflammatoires pulmonaires peuvent être d'origine génétique comme la mucoviscidose ou bien environnementales (pollution, tabagisme, allergènes) comme l'asthme, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) ou encore la silicose. Elles aboutissent à une dégradation progressive du tissu pulmonaire le plus souvent associée à une obstruction des voies respiratoires, ainsi les patients souffrant de ce type de pathologies décèdent de façon prématurée suite à une insuffisance respiratoire. Ces pathologies sont caractérisées entre autre par un déséquilibre de la balance oxydant/antioxydant mais également de la balance protéases/antiprotéases lié au recrutement massif de cellules de l'immunité comme les neutrophiles et les macrophages au niveau du tissu pulmonaire. Les cathepsines à cystéine participent à la dégradation du tissu pulmonaire aux côtés des MMPs (MMP-2, MMP-9 et MMP-12) et des protéases à sérine de neutrophile (HNE, Pr3 et CatG). Les protéines de la matrice extracellulaire comme l'élastine ainsi que les protéines de la membrane basale comme le collagène IV, la fibronectine, les laminines et les nidogènes font partie des cibles potentielles des cathepsines à cystéine. L'inflammation pulmonaire s'accompagne également d'une diminution de la capacité de l'épithélium pulmonaire à combattre l'infection et la colonisation par des micro-organismes pathogènes. Les cathepsines à cystéine (B, L et S) participent à ce phénomène en inactivant plusieurs peptides et protéines antimicrobiens (PAMs) pulmonaires comme le SLPI, la lactoferrine, la protéine du surfactant SP-A et les β -défensines -2 et -3 qui sont pourtant connues pour être résistantes à la protéolyse du fait de leur structure compacte stabilisée par des ponts disulfures (Taggart *et al.*, 2001; Taggart *et al.*, 2003; Rogan *et al.*, 2004; Lecaille *et al.*, 2013). Cependant, aucune étude n'a porté sur l'hydrolyse de la cathélicidine LL-37 par les cathepsines à cystéine.

Au cours de cette thèse, nous avons montré que le peptide LL-37 est une cible potentielle des cathepsines à cystéine K et S exprimées par les macrophages alvéolaires. L'hydrolyse du LL-37 par les cathepsines K et S aboutit à la perte de l'activité antimicrobienne du peptide sur *E. coli*, *P. aeruginosa* et *S. aureus*. Cependant, dans des conditions d'hydrolyse ménagée, les cathepsines K et S parviennent à générer un fragment peptidique appelé DF-22, qui possède une activité antimicrobienne comparable à celle du LL-37 et qui n'a pas été décrit dans la littérature jusqu'à présent. Il serait intéressant d'étudier les propriétés physiologiques de DF-22 telles que sa cytotoxicité (potentiel hémolytique) par analogie avec une étude réalisée sur le peptide IG-19, un fragment du LL-37 qui possède une activité antimicrobienne comparable à LL-37 (Nan *et al.*, 2012). Les propriétés endotoxiques du LPS sont liées à sa capacité à induire une sécrétion massive et potentiellement létale de TNF- α par les macrophages. Ainsi

les propriétés neutralisantes de DF-22 vis-à-vis du LPS pourront être étudiées en examinant l'influence de DF-22 sur la sécrétion de TNF- α par les macrophages induite par le LPS. La génération protéolytique de peptides antimicrobiens dérivés du LL-37 est un phénomène qui a été décrit au niveau de la peau, le clivage du côté N-terminal du LL-37 par les kallicréines-5 et -7 épidermiques génère deux fragments : RK-31 et KS-30, qui conservent leur propriétés antimicrobiennes (Murakami *et al.*, 2004; Yamasaki *et al.*, 2006). L'hydrolyse du LL-37 par les cathepsines S et K pourrait se produire également dans la peau où le peptide et les deux cathepsines sont exprimés au niveau de l'épiderme, mais également dans d'autres organes. Dans l'épithélium buccal par exemple, il a été proposé que lors de gingivites, des protéases humaines telles que l'HNE, la CatG, la MMP-9 et la cathepsine K participeraient à la dégradation du LL-37 aux côtés de protéases bactériennes comme la gingipaine de *P. gingivalis* (McCrudden *et al.*, 2013).

De plus, LL-37 peut être cytotoxique pour les cellules de l'hôte pour des concentrations comprises entre 10 et 100 μ M (Johansson *et al.*, 1998; Tjabringa *et al.*, 2005; Nan *et al.*, 2012). Le clivage du LL-37 par les cathepsines à cystéine pourrait donc avoir un effet protecteur lors de phases inflammatoires durant lesquelles le peptide LL-37 est massivement sécrété dans les poumons. D'autre part, il a été montré dans des LBAs de patients atteints de mucoviscidose que le peptide LL-37 peut se complexer avec des GAGs via des interactions électrostatiques et le protégeant ainsi de la dégradation protéolytique (Bergsson *et al.*, 2009). L'utilisation d'une solution hypersaline dissocie les complexes et aboutit à l'hydrolyse du peptide par les protéases de l'hôte comme l'HNE et la cathepsine D (Bergsson *et al.*, 2009). Notre étude a montré que les GAGs sulfatés comme l'héparane sulfate (HS), le chondroïtine 4-sulfate (C4-S) et l'héparine (HP) bloquent de façon dose dépendante l'hydrolyse du LL-37 par les cathepsines K et S. L'effet protecteur des GAGs est levé en présence de NaCl. L'ensemble de nos résultats corroborent ceux de Bergsson et collaborateurs et contribuent à mieux comprendre la présence du peptide LL-37 dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose, alors que d'autres PAMs sont totalement dégradés en particulier par les cathepsines. Nos travaux ont démontré que le peptide LL-37 est un inhibiteur sélectif de la cathepsine L comme cela a été proposé dans une étude récente qui a montré que la proforme hCAP-18 ainsi que le peptide mature LL-37 diminuent l'activité enzymatique de la cathepsine L contrairement au domaine cathéline seul, suggérant que l'activité inhibitrice de la pro-cathélicidine serait liée au LL-37 (Pazgier *et al.*, 2013). Nous avons caractérisé le type d'inhibition exercée par le peptide ainsi que les résidus du site actif de la cathepsine L

impliqués dans l'interaction entre l'enzyme et LL-37. Par une approche *in silico*, nous avons montré que le peptide LL-37 se positionne uniquement dans le site actif de la cathepsine L via des interactions électrostatiques et adopterait deux positions différentes au niveau du site actif de l'enzyme : une position similaire à celle d'un substrat et une autre position inversée. La position inversée pourrait être à l'origine du potentiel inhibiteur du LL-37, de façon analogue au propeptide de la cathepsine L qui se loge dans le site actif en position inversée, lui permettant ainsi de résister à la protéolyse et d'inhiber sélectivement l'enzyme mature ($K_i = 0.088$ nM) (Coulombe *et al.*, 1996; Carmona *et al.*, 1996). De façon intéressante, l'alignement de séquence entre le propeptide de la cathepsine L (96 résidus) et le peptide LL-37 ou sa forme inversée SE-37 montre que la séquence KIGKEFKRIV du peptide s'aligne avec celle du propeptide entre les résidus valine 74p et proline 83p de la prorégion (**Figure 27**). Ce segment de la prorégion comporte une courte hélice- α et contient la séquence MNGFQ qui est positionnée au niveau du site actif de la cathepsine L (Carmona *et al.*, 1996).

	1p	10p	20p	30p	40p	50p	60p
hCatL	TLTFDHSLEA	QWTKWKAMHN	RLYGMNEEGW	RRAVWEKNMK	MIELHNQEYR	EGKHSFTMAM	
LL-37	-----	-----	-----	-----	-----	-----	LLG
SE-37	-----	-----	-----	-----	-----	--	SETRPVRL
							:
	70p	80p	90p	96p			
hCatL	NAFGDMTSEE	FRQVMNGFQN	RKPRKGKVFQ	EPLFYE---			
LL-37	DFFR-----K	SKEKIGKEFK	RIVQRIKDFL	NLRVPRTES			
SE-37	NLFD-----K	IRQVIRKFEK	GIKEKSKRFF	DGLL-----			
	: *	: :: :	: .: * *	: .			

Figure 27 : Alignement des séquences du propeptide de la cathepsine L avec le LL-37 et le SE-37.

L'alignement de séquence a été réalisé via Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (résultats personnels)

La conformation en hélice- α pourrait avoir une importance dans le caractère sélectif de l'inhibition de la cathepsine L par LL-37, puisqu'il a été montré qu'un décapeptide dérivé de la calpastatine (inhibiteur endogène des calpaïnes) structuré en hélice- α possède une inhibition apparente plus élevée vis-à-vis de la cathepsine L ($K_i = 40$ μ M) comparé à la papaïne et à la cathepsine B ($K_i > 100$ μ M) (Jo *et al.*, 2012). D'après les résultats de modélisation, la séquence KIGKEFKRIV du peptide (position inversée), interagit avec les sous-sites S1 à S3 de l'enzyme (**Figure 28**). Cette séquence peptidique pourrait servir de modèle pour le développement d'inhibiteurs non covalents structurés en hélice- α et sélectifs de la cathepsine L selon une approche similaire à celle envisagée lors du développement

d'inhibiteurs pseudo-peptidiques sélectifs des protéases à cystéine et dérivés de leur propeptide (Schaschke *et al.*, 1998; Lalmanach *et al.*, 1998; Chowdhury *et al.*, 2002).

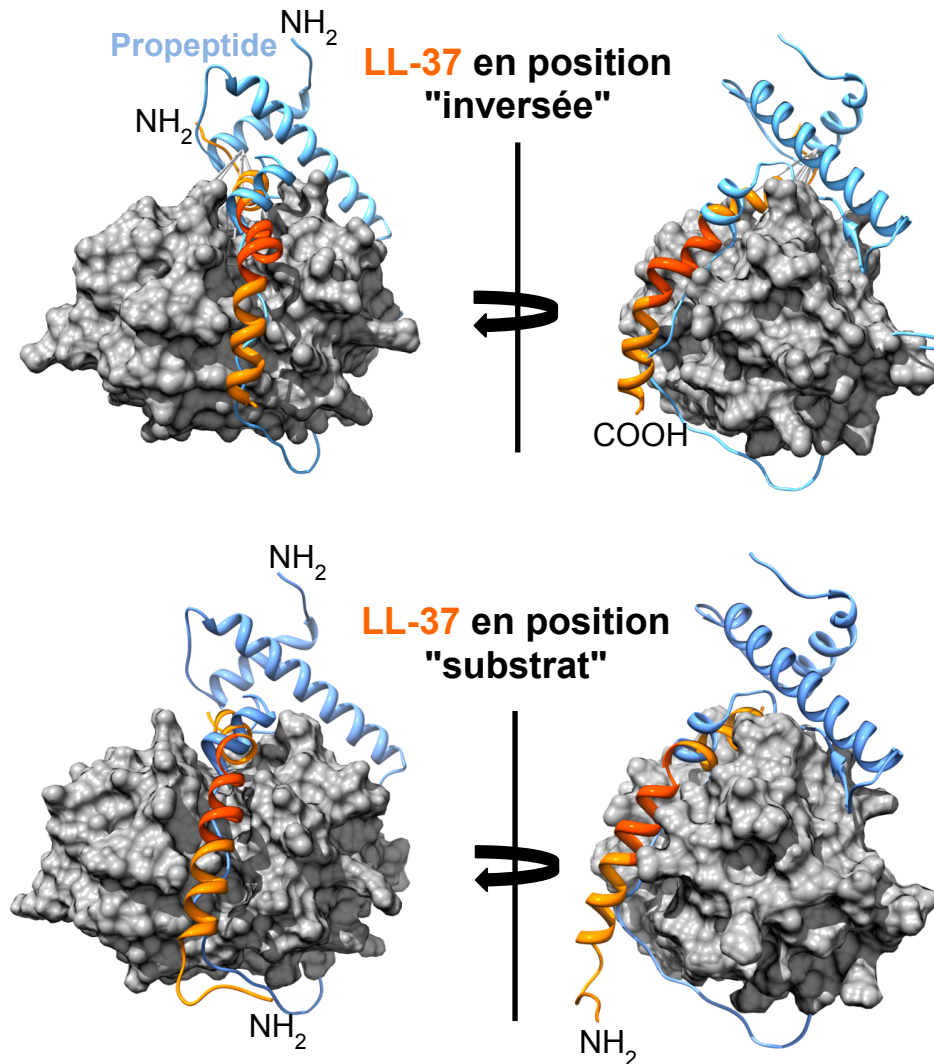


Figure 28 : Superposition du peptide LL-37 (en position substrat et inversé) avec le propeptide de la cathepsine L.

Le LL-37 (représentation en ruban) est en orange et la séquence KIGKEFKRIV en orange foncé. Le propeptide de la cathepsine L (représentation en ruban) est en bleu et la cathepsine L est en gris (représentation en potentiel de surface).

Le rôle physiologique de l'inhibition de la cathepsine L par le LL-37 reste encore à étudier. Au niveau de la peau par exemple, les niveaux d'expression de la cathepsine L et du LL-37 sont augmentés lors de pathologies cutanées inflammatoires comme le psoriasis ou dans les cancers de la peau comme le mélanome (Ong *et al.*, 2002; Bylaite *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2010). L'augmentation de l'expression du LL-37 dans ce contexte pourrait contribuer à limiter la dégradation des protéines de la matrice extracellulaire par la cathepsine L, de la même manière que la stéfine A par exemple, qui ralentit la migration des cellules cancéreuses

de la peau en inhibant la cathepsine L (Palungwachira *et al.*, 2002). De façon intéressante, il existe à l'heure actuelle une étude clinique de phase III sur le traitement du mélanome métastatique par injection intratumorale de LL-37 (Rodabe N. Amaria, M.D. Anderson Cancer Center, Etats-Unis, n° d'étude : NCT02225366)

D'autres pathologies pulmonaires inflammatoires comme la BPCO peuvent s'accompagner d'une infection bactérienne ou virale des voies respiratoires appelée bronchite chronique et qui peut favoriser l'exacerbation de la maladie (Hill *et al.*, 2000; Chin *et al.*, 2005). L'exposition à la fumée de cigarette constitue un risque majeur (80 à 90%) de développer une BPCO et les fumeurs souffrent plus souvent d'infections pulmonaires que les non-fumeurs (Almirall *et al.*, 2014). D'autre part, les poumons de patients atteints de BPCO sont colonisés dans 30 à 40% des cas par des bactéries comme *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* et *H. influenzae* (Monsó *et al.*, 1995; Zalacain *et al.*, 1999; Sethi & Murphy, 2008). L'inflammation du tissu pulmonaire provoquée par l'inhalation de fumée de cigarette et l'infection chronique des bronches est entretenue par les neutrophiles et les macrophages qui sécrètent des quantités importantes d'enzymes protéolytiques et d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (Rahman *et al.*, 1996; Gompertz *et al.*, 2001). Le rôle physiopathologique des protéases à sérine comme l'HNE, la CatG et la Pr3 et des métalloprotéases matricielles comme les MMP-2, -9 et -12 sont bien décrits dans la BPCO (Parks *et al.*, 2004; Korkmaz *et al.*, 2010; Trojanek *et al.*, 2014). A l'inverse, peu d'études ont porté sur le profil d'expression des cathepsines à cystéine humaines dans la BPCO et en particulier leur régulation par la fumée de la cigarette.

L'expression des cathepsines B, H, L et S pulmonaires est augmentée significativement ($p < 0.01$) chez des patients fumeurs atteints ou non de BPCO par rapport à des patients non-fumeurs et non BPCO. De plus, leur expression à l'exception de la cathepsine H, est plus importante chez les fumeurs actifs que chez les anciens fumeurs, suggérant l'importance de la fumée de cigarette dans la régulation de l'expression de certaines cathepsines à cystéine. L'expression de la cathepsine S dans les tissus pulmonaires est fortement augmentée chez les fumeurs actifs atteints ou non de BPCO par rapport aux cathepsines B, L et H, et présente une tendance à augmenter avec le stade de sévérité de la maladie. Son expression et son activité sont également augmentées dans des expectorations de patients BPCO en phase d'exacerbation. De plus, la fumée de cigarette est l'un des agents responsables de la surexpression de la cathepsine S dans un modèle de cellules bronchiques humaines. Le stress oxydatif lié à la fumée de cigarette stimule l'expression par les cellules épithéliales

bronchiques et par les cellules de l'immunité (lymphocytes T et macrophages) de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, le TNF- α et l'IFN- γ , qui augmentent la production d'HNE, MMP-2, -9 et -12, et des cathepsines B, L et S (Barnes *et al.*, 2003; Barnes, 2004; Gao *et al.*, 2015; Solleiro-Villavicencio *et al.*, 2015). L'expression de la cathepsine S par les macrophages est stimulée par l'IFN- γ dans des lavages bronchoalvéolaires (LBAs) de patients atteints de BPCO et l'inhibition pharmacologique de l'enzyme chez la souris réduit significativement l'inflammation pulmonaire provoquée par exposition à l'ozone, ce qui suggère un rôle clé de la cathepsine S dans l'inflammation pulmonaire associée au stress oxydatif (Geraghty *et al.*, 2008; Williams *et al.*, 2009). De façon surprenante, l'expression de l'IFN- γ est réduite dans les tissus pulmonaires de patients fumeurs atteints de BPCO comparée aux patients non BPCO, ce qui suggère que la régulation de l'expression de la cathepsine S dans le tissu pulmonaire pourrait être contrôlée par d'autres cytokines comme l'IL-18 ou l'IL-13 par exemple (Zheng *et al.*, 2000; Kang *et al.*, 2007). Nos expériences *in vitro* montrent que la cathepsine S est relativement stable en présence d'agents oxydants comme la fumée de cigarette. De plus, la maturation autocatalytique de la procathepsine S est peu sensible à la fumée de cigarette ou au peroxyde d'hydrogène (résultats personnels) contrairement à la cathepsine K (Godat *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que malgré des similarités de séquences entre les cathepsines S et K (57%) et une conformation tridimensionnelle proche, il existe des différences dans les résidus qui composent le site actif qui semblent être importantes dans la résistance de la cathepsine S au stress oxydatif. Une étude de mutagenèse dirigée permettrait d'identifier le(s) résidu(s) impliqué(s) dans la résistance de la cathepsine S au stress oxydatif. D'autre part, d'autres espèces oxydantes comme le monoxyde d'azote inhibent l'automaturation de la procathepsine K et inactivent la forme mature (Percival *et al.*, 1999). Il serait intéressant de tester *in vitro* l'activité de la cathepsine S ainsi que la maturation du proenzyme en présence de péroxinitrite qui est une espèce réactive de l'azote majoritairement présente, comme le peroxyde d'hydrogène, dans la fumée de cigarette (Pryor & Stone, 1993). L'effet d'agents oxydants (fumée de cigarette, peroxyde d'hydrogène, péroxinitrite) sur l'état d'oxydation du thiol de la cystéine du site actif de la cathepsine S (réversible sous la forme d'acide sulfénique (-SOH), ou irréversible sous la forme d'acide sulfinique (-SO₂H) /sulfonique (-SO₃H)) ainsi que sur la structure secondaire seront également étudiés. D'autre part, les effets de l'oxydation sur l'expression et l'activité des inhibiteurs endogènes des cathepsines à cystéine seront étudiés, afin de mesurer la balance cathepsines/anti-cathepsines dans la BPCO. Il a notamment été

montré que des inhibiteurs de protéases comme l' α 1-antitrypsine (AAT), le SLPI ou le TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) oxydés au niveau de résidus méthionine perdent leurs propriétés inhibitrices vis-à-vis de l'HNE, de la CatG et de la MMP-9 (Dooley & Pryor, 1982; Johnson, 1987; Heinzl-Wieland *et al.*, 1991; Cavarra *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007). Durant notre étude, nous avons remarqué que l'expression intracellulaire de la stéfine B dans les lysats de cellules pHBECS est réduite de façon dose dépendante par la fumée de cigarette après 2 heures de traitement, favorisant ainsi l'activité des cathepsines dans ces échantillons. De la même manière, l'expression de la cystatine C est fortement réduite dans les expectorations de patients BPCO en phase d'exacerbation comparée à des patients BPCO stables (**Figure 29**). L'étude *in vitro* de l'inhibition des cathepsines B, K, L et S par leurs inhibiteurs endogènes tels que la cystatine C, les stéfines A et B et les kininogènes (LMWK et HMWK) oxydés par la fumée de cigarette, le peroxyde d'hydrogène ou les peroxydinitrites sera envisagée.

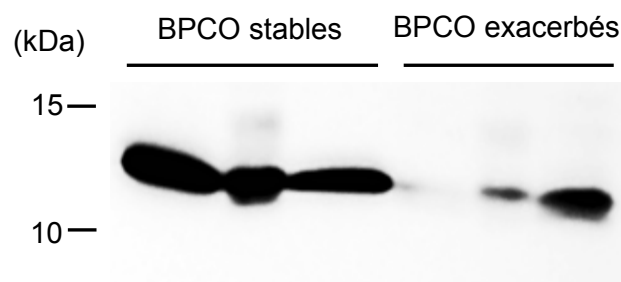


Figure 29 : Détection par Western Blot de la cystatine C dans des expectorations de patients atteints de BCPO stable ou en phase d'exacerbation. (résultat personnel)

Nous avons montré que l'expression de la procathélicidine hCAP-18 est augmentée dans les expectorations de patients BPCO exacerbés par rapport aux patients BPCO stables. Cependant, contrairement à d'autres études qui montrent que le LL-37 est augmenté dans la BPCO (Xiao *et al.*, 2005; Tsoumakidou *et al.*, 2010; Parameswaran *et al.*, 2011; Golec *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2012), le peptide n'est pas ou peu présent dans les expectorations de patients fumeurs atteints ou non de BPCO stable ou exacerbée. La cathepsine S peut participer à la dégradation du LL-37 dans les expectorations de patients BPCO, et plus particulièrement lors des phases d'exacerbation. Une étude récente réalisée sur un modèle murin infecté par la bactérie *H. influenzae* a montré que la colonisation pulmonaire de l'animal est plus importante chez les souris exposées à la fumée de cigarette comparée aux souris non traitées et que ce phénomène est associé à une diminution de la concentration pulmonaire en β -défensine-1 murine (Voss *et al.*, 2015). Notre unité a développé des modèles murins de BPCO stable (exposition de souris à la fumée de cigarette) et de BPCO exacerbée (souris exposées à la

fumée de cigarette et au LPS bactérien ou infectées avec le virus de la grippe). Ces modèles seront utilisés pour analyser l'expression et l'activité de la cathepsine S dans le tissu pulmonaire et le lavage broncho-alvéolaire. Cela devrait permettre de caractériser les changements d'expression et d'activité de la cathepsine S vis-à-vis de certains PAMs au cours des différentes phases de la BPCO et donc d'accréditer notre hypothèse de travail. De plus, l'hypothèse selon laquelle la surexpression de la cathepsine S liée au tabagisme est défavorable à l'immunité innée pourrait être validée à l'aide de modèles de souris transgéniques déficientes en cathepsine S infectées par *H. influenzae* et traitées ou non avec de la fumée de cigarette. D'autre part, il a été montré que l'augmentation de l'expression des peptidylarginine déiminases (PADIs) pulmonaires chez les fumeurs aboutit à la conversion des arginines cationiques du LL-37 en citrulline non chargées (Kilsgård *et al.*, 2012). Le LL-37 modifié par les PADI-2 et -4 est plus sensible à la dégradation par des enzymes protéolytiques comme la protéase V8 (protéase à glutamate) et la staphopaine (protéase à cystéine) de *S. aureus* et l'HNE humaine. La modification du LL-37 par les PADIs pourrait favoriser l'hydrolyse du peptide par la cathepsine S dans les poumons de patients fumeurs.

L'hydrolyse par la cathepsine S d'autres cibles biologiques du tissu pulmonaire, comprenant des protéines de la matrice extracellulaire et de la membrane basale comme l'élastine, la fibronectine, les laminines, les collagènes et les nidogènes pourrait être une voie intéressante à étudier. Ces études permettront de mettre à jour le rôle joué par la cathepsine S dans les remodelages pulmonaires associés à la BPCO afin d'identifier des cibles potentielles pour des thérapies innovantes.

Bibliographie

A

- Abou Alaiwa, M.H., Reznikov, L.R., Gansemer, N.D., Sheets, K.A., Horswill, A.R., Stoltz, D.A., *et al.* (2014) pH modulates the activity and synergism of the airway surface liquid antimicrobials β -defensin-3 and LL-37. *Proc Natl Acad Sci* **111**: 18703–18708.
- Abrahamson, M. (1994) Cystatins. *Methods Enzymol* **244**: 685–700.
- Abrahamson, M., Alvarez-Fernandez, M., and Nathanson, C.-M. (2003) Cystatins. *Biochem Soc Symp* 179–199.
- Abrahamson, M., Barrett, A.J., Salvesen, G., and 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., Buttle, D.J., Mason, R.W., Hansson, H., Grubb, A., Lilja, H., and Ohlsson, K. (1991) Regulation of cystatin C activity by serine proteinases. *Biomed Biochim Acta* **50**: 587–593.
- Abrahamson, M., Ritonja, A., Brown, M.A., Grubb, A., Machleidt, W., and 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.
- Adams-Cioaba, M.A., Krupa, J.C., Xu, C., Mort, J.S., and Min, J. (2011) Structural basis for the recognition and cleavage of histone H3 by cathepsin L. *Nat Commun* **2**: 197.
- Adkison, A.M., Raptis, S.Z., Kelley, D.G., and 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.
- Afacan, N.J., Yeung, A.T.Y., Pena, O.M., and Hancock, R.E.W. (2012) Therapeutic potential of host defense peptides in antibiotic-resistant infections. *Curr Pharm Des* **18**: 807–819.
- Agerberth, B., Charo, J., Werr, J., Olsson, B., Idali, F., Lindbom, L., *et al.* (2000) The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* **96**: 3086–3093.
- Agerberth, B., Gunne, H., Odeberg, J., Kogner, P., Boman, H.G., and Gudmundsson, G.H. (1995) FALL-39, a putative human peptide antibiotic, is cysteine-free and expressed in bone marrow and testis. *Proc Natl Acad Sci* **92**: 195–199.
- Aggarwal, N., and Sloane, B.F. (2014) Cathepsin B: multiple roles in cancer. *Proteomics Clin Appl* **8**: 427–437.
- Akinbi, H.T., Epauld, R., Bhatt, H., and Weaver, T.E. (2000) Bacterial killing is enhanced by expression of lysozyme in the lungs of transgenic mice. *J Immunol* **165**: 5760–5766.
- Almeida, P.C., Nantes, I.L., Chagas, J.R., Rizzi, C.C., Faljoni-Alario, A., Carmona, E., *et al.* (2001) Cathepsin B activity regulation. Heparin-like glycosaminoglycans protect human cathepsin B from alkaline pH-induced inactivation. *J Biol Chem* **276**: 944–951.

Almirall, J., Blanquer, J., and Bello, S. (2014) Community-acquired pneumonia among smokers. *Arch Bronconeumol* **50**: 250–254.

Amer, L.S., Bishop, B.M., and Hoek, M.L. van (2010) Antimicrobial and antibiofilm activity of cathelicidins and short, synthetic peptides against *Francisella*. *Biochem Biophys Res Commun* **396**: 246–251.

Appelmelk, B.J., An, Y.Q., Geerts, M., Thijs, B.G., Boer, H.A. de, MacLaren, D.M., *et al.* (1994) Lactoferrin is a lipid A-binding protein. *Infect Immun* **62**: 2628–2632.

Asaad, N., Bethel, P.A., Coulson, M.D., Dawson, J.E., Ford, S.J., Gerhardt, S., *et al.* (2009) Dipeptidyl nitrile inhibitors of Cathepsin L. *Bioorg Med Chem Lett* **19**: 4280–4283.

Ascenzi, P., Salvati, L., Bolognesi, M., Colasanti, M., Polticelli, F., and Venturini, G. (2001) Inhibition of cysteine protease activity by NO-donors. *Curr Protein Pept Sci* **2**: 137–153.

B

Baker, E.N., and Baker, H.M. (2005) Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin. *Cell Mol Life Sci* **62**: 2531–2539.

Bals, R. (2000) Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res* **1**: 141 – 150.

Bals, R., Wang, X., Wu, Z., Freeman, T., Bafna, V., Zasloff, M., and Wilson, J.M. (1998) Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest* **102**: 874–880.

Bals, R., Wang, X., Zasloff, M., and Wilson, J.M. (1998) The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 9541–9546.

Bals, R., Weiner, D.J., Meegalla, R.L., Accurso, F., and Wilson, J.M. (2001) Salt-Independent Abnormality of Antimicrobial Activity in Cystic Fibrosis Airway Surface Fluid. *Am J Respir Cell Mol Biol* **25**: 21–25.

Bals, R., Weiner, D.J., Meegalla, R.L., and Wilson, J.M. (1999) Transfer of a cathelicidin peptide antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model. *J Clin Invest* **103**: 1113–1117.

Bals, R., Weiner, D.J., Moscioni, A.D., Meegalla, R.L., and Wilson, J.M. (1999) Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect Immun* **67**: 6084–6089.

Baranger, K., Zani, M.-L., Chandenier, J., Dallet-Choisy, S., and Moreau, T. (2008) The antibacterial and antifungal properties of trappin-2 (pre-elafin) do not depend on its protease inhibitory function. *FEBS J* **275**: 2008–2020.

Barnes, P.J. (2004) Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev* **56**: 515–548.

- Barnes, P.J., Shapiro, S.D., and Pauwels, R.A. (2003) Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms. *Eur Respir J* **22**: 672–688.
- Barrett, A.J. (1986) The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. *Biomed Biochim Acta* **45**: 1363–1374.
- Barrett, A.J. (1992) Cellular proteolysis. An overview. *Ann N Y Acad Sci* **674**: 1–15.
- Barrett, A.J., Fritz, H., Grubb, A., Isemura, S., Järvinen, M., Katunuma, N., *et al.* (1986) Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. *Biochem J* **236**: 312.
- Barrett, A.J., Kembhavi, A.A., Brown, M.A., Kirschke, H., Knight, C.G., Tamai, M., and Hanada, K. (1982) L-trans-Epoxy succinyl-leucylamido(4-guanidino)butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem J* **201**: 189–198.
- Barrett, A.J., Kembhavi, A.A., and Hanada, K. (1981) E-64 [L-trans-epoxy succinyl-leucyl-amido(4-guanidino)butane] and related epoxides as inhibitors of cysteine proteinases. *Acta Biol Med Ger* **40**: 1513–1517.
- Barrett, A.J., and Kirschke, H. (1981) Cathepsin B, Cathepsin H, and cathepsin L. *Methods Enzymol* **80 Pt C**: 535–561.
- Barrett, A.J., and 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.
- Barry, Z.T., and Platt, M.O. (2012) Cathepsin S cannibalism of cathepsin K as a mechanism to reduce type I collagen degradation. *J Biol Chem* **287**: 27723–27730.
- Baughman, R.P., Culver, D.A., and Judson, M.A. (2011) A Concise Review of Pulmonary Sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med* **183**: 573–581.
- Beamer, L.J., Carroll, S.F., and Eisenberg, D. (1997) Crystal structure of human BPI and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution. *Science* **276**: 1861–1864.
- Bechinger, B. (1999) The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by multidimensional solid-state NMR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **1462**: 157–183.
- Belas, R., Manos, J., and Suvanasuthi, R. (2004) *Proteus mirabilis* ZapA metalloprotease degrades a broad spectrum of substrates, including antimicrobial peptides. *Infect Immun* **72**: 5159–5167.
- Bensch, K.W., Raida, M., Mägert, H.J., Schulz-Knappe, P., and Forssmann, W.G. (1995) hBD-1: a novel beta-defensin from human plasma. *FEBS Lett* **368**: 331–335.
- Berdowska, I. (2004) Cysteine proteases as disease markers. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* **342**: 41–69.

- Bergsson, G., Reeves, E.P., McNally, P., Chotirmall, S.H., Greene, C.M., Greally, P., *et al.* (2009) LL-37 Complexation with Glycosaminoglycans in Cystic Fibrosis Lungs Inhibits Antimicrobial Activity, Which Can Be Restored by Hypertonic Saline. *J Immunol* **183**: 543–551.
- Berkebile, A.R., and McCray, P.B. (2014) Effects of airway surface liquid pH on host defense in cystic fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* **52**: 124–129.
- Berkel, P.H. van, Geerts, M.E., Veen, H.A. van, Mericskay, M., Boer, H.A. de, and Nuijens, J.H. (1997) N-terminal stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA. *Biochem J* **328 (Pt 1)**: 145–151.
- Berkhout, B., Floris, R., Recio, I., and Visser, S. (2004) The antiviral activity of the milk protein lactoferrin against the human immunodeficiency virus type 1. *Biomaterials Int J Role Met Ions Biol Biochem Med* **17**: 291–294.
- Berkhout, B., Wamel, J.L.B. van, Beljaars, L., Meijer, D.K.F., Visser, S., and Floris, R. (2002) Characterization of the anti-HIV effects of native lactoferrin and other milk proteins and protein-derived peptides. *Antiviral Res* **55**: 341–355.
- Berlutti, F., Morea, C., Battistoni, A., Sarli, S., Cipriani, P., Superti, F., *et al.* (2005) Iron availability influences aggregation, biofilm, adhesion and invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*. *Int J Immunopathol Pharmacol* **18**: 661–670.
- Berti, P.J., and Storer, A.C. (1995) Alignment/phylogeny of the papain superfamily of cysteine proteases. *J Mol Biol* **246**: 273–283.
- Bevec, T., Stoka, V., Pungercic, G., Cazzulo, J.J., and 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.
- Béven, L., Helluin, O., Molle, G., Duclohier, H., and Wróblewski, H. (1999) Correlation between anti-bacterial activity and pore sizes of two classes of voltage-dependent channel-forming peptides. *Biochim Biophys Acta* **1421**: 53–63.
- Bhavsar, T., Liu, M., Hardej, D., Liu, X., and Cantor, J. (2010) Aerosolized recombinant human lysozyme ameliorates *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia in hamsters. *Exp Lung Res* **36**: 94–100.
- Bhavsar, T., Liu, M., Liu, X., and Cantor, J. (2011) Aerosolized recombinant human lysozyme enhances the bactericidal effect of tobramycin in a hamster model of *Pseudomonas aeruginosa*-induced pneumonia. *Exp Lung Res* **37**: 536–541.
- Björk, I., and Ylinenjärvi, K. (1990) Interaction between chicken cystatin and the cysteine proteinases actinidin, chymopapain A, and ficin. *Biochemistry* **29**: 1770–1776.
- Blomgran, R., Zheng, L., and Stendahl, O. (2007) Cathepsin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization. *J Leukoc Biol* **81**: 1213–1223.

Bode, W., Engh, R., Musil, D., Laber, B., Stubbs, M., Huber, R., and 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.

Bode, W., Engh, R., Musil, D., Thiele, U., Huber, R., Karshikov, A., *et al.* (1988) The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *EMBO J* **7**: 2593–2599.

Bode, W., and Huber, R. (1992) Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases. *Eur J Biochem FEBS* **204**: 433–451.

Boggaram, V., Smith, M.E., and Mendelson, C.R. (1989) Regulation of expression of the gene encoding the major surfactant protein (SP-A) in human fetal lung in vitro. Disparate effects of glucocorticoids on transcription and on mRNA stability. *J Biol Chem* **264**: 11421–11427.

Bojic, L., Petelin, A., Stoka, V., Reinheckel, T., Peters, C., Turk, V., and Turk, B. (2007) Cysteine cathepsins are not involved in Fas/CD95 signalling in primary skin fibroblasts. *FEBS Lett* **581**: 5185–5190.

Boman, H.G. (1995) Peptide Antibiotics and their Role in Innate Immunity. *Annu Rev Immunol* **13**: 61–92.

Boman, H.G., Agerberth, B., and Boman, A. (1993) Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect Immun* **61**: 2978–2984.

Boudreau, F., Lussier, C.R., Mongrain, S., Darsigny, M., Drouin, J.L., Doyon, G., *et al.* (2007) Loss of cathepsin L activity promotes claudin-1 overexpression and intestinal neoplasia. *FASEB J* **21**: 3853–3865.

Brandt, T., Breitenstein, S., Hardt, H. von der, and Tümmler, B. (1995) DNA concentration and length in sputum of patients with cystic fibrosis during inhalation with recombinant human DNase. *Thorax* **50**: 880–882.

Bratcher, P.E., Weathington, N.M., Nick, H.J., Jackson, P.L., Snelgrove, R.J., and Gaggar, A. (2012) MMP-9 cleaves SP-D and abrogates its innate immune functions in vitro. *PloS One* **7**: e41881.

Breukink, E., and Kruijff, B. de (1999) The lantibiotic nisin, a special case or not? *Biochim Biophys Acta* **1462**: 223–234.

Brix, K., Dunkhorst, A., Mayer, K., and 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., *et al.* (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.

Brogan, T.D., Ryley, H.C., Neale, L., and Yassa, J. (1975) Soluble proteins of bronchopulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, asthma, and bronchitis. *Thorax* **30**: 72–79.

Brogden, K.A. (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Micro* **3**: 238–250.

Brömme, D., Klaus, J.L., Okamoto, K., Rasnick, D., and Palmer, J.T. (1996a) Peptidyl vinyl sulphones: a new class of potent and selective cysteine protease inhibitors: S2P2 specificity of human cathepsin O2 in comparison with cathepsins S and L. *Biochem J* **315** (Pt 1): 85–89.

Brömme, D., and Lecaille, F. (2009) Cathepsin K inhibitors for osteoporosis and potential off-target effects. *Expert Opin Investig Drugs* **18**: 585–600.

Brömme, D., Li, Z., Barnes, M., and Mehler, E. (1999) Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potential, enzymatic characterization, and chromosomal localization. *Biochemistry* **38**: 2377–2385.

Brömme, D., and Okamoto, K. (1995) Human cathepsin O2, a novel cysteine protease highly expressed in osteoclastomas and ovary molecular cloning, sequencing and tissue distribution. *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**: 379–384.

Brömme, D., Okamoto, K., Wang, B.B., and Biroc, S. (1996b) Human cathepsin O2, a matrix protein-degrading cysteine protease expressed in osteoclasts. Functional expression of human cathepsin O2 in *Spodoptera frugiperda* and characterization of the enzyme. *J Biol Chem* **271**: 2126–2132.

Brûle, S. van den, Misson, P., Bühling, F., Lison, D., and Huaux, F. (2005) Overexpression of cathepsin K during silica-induced lung fibrosis and control by TGF-beta. *Respir Res* **6**: 84.

Bucki, R., Byfield, F.J., and Janmey, P.A. (2007) Release of the antimicrobial peptide LL-37 from DNA/F-actin bundles in cystic fibrosis sputum. *Eur Respir J* **29**: 624–632.

Bucki, R., Namiot, D.B., Namiot, Z., Savage, P.B., and Janmey, P.A. (2008) Salivary mucins inhibit antibacterial activity of the cathelicidin-derived LL-37 peptide but not the cationic steroid CSA-13. *J Antimicrob Chemother* **62**: 329–335.

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

Bühling, F., Röcken, C., Brasch, F., Hartig, R., Yasuda, Y., Saftig, P., *et al.* (2004b) Pivotal Role of Cathepsin K in Lung Fibrosis. *Am J Pathol* **164**: 2203–2216.

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

Bulet, P., Stöcklin, R., and Menin, L. (2004) Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev* **198**: 169–184.

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

Burton, M.F., and Steel, P.G. (2009) The chemistry and biology of LL-37. *Nat Prod Rep* **26**: 1572.

Büth, H., Wolters, B., Hartwig, B., Meier-Bornheim, R., Veith, H., Hansen, M., *et al.* (2004) HaCaT keratinocytes secrete lysosomal cysteine proteinases during migration. *Eur J Cell Biol* **83**: 781–795.

Buttle, D.J., Abrahamson, M., Burnett, D., Mort, J.S., Barrett, A.J., Dando, P.M., and Hill, S.L. (1991) Human sputum cathepsin B degrades proteoglycan, is inhibited by alpha 2-macroglobulin and is modulated by neutrophil elastase cleavage of cathepsin B precursor and cystatin C. *Biochem J* **276** (Pt 2): 325–331.

Bylaite, M., Moussali, H., Marciukaitiene, I., Ruzicka, T., and Walz, M. (2006) Expression of cathepsin L and its inhibitor hurpin in inflammatory and neoplastic skin diseases. *Exp Dermatol* **15**: 110–118.

C

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.

Canny, G., Levy, O., Furuta, G.T., Narravula-Alipati, S., Sisson, R.B., Serhan, C.N., and Colgan, S.P. (2002) Lipid mediator-induced expression of bactericidal/ permeability-increasing protein (BPI) in human mucosal epithelia. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 3902–3907.

Carlisle, M.D., Srikantha, R.N., and Brogden, K.A. (2009) Degradation of human alpha- and beta-defensins by culture supernatants of *Porphyromonas gingivalis* strain 381. *J Innate Immun* **1**: 118–122.

Carmona, E., Dufour, E., Plouffe, C., Takebe, S., Mason, P., Mort, J.S., and Ménard, R. (1996) Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases. *Biochemistry* **35**: 8149–8157.

Casaburi, R., and ZuWallack, R. (2009) Pulmonary rehabilitation for management of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* **360**: 1329–1335.

Cavarra, E., Lucattelli, M., Gambelli, F., Bartalesi, B., Fineschi, S., Szarka, A., *et al.* (2001) Human SLPI inactivation after cigarette smoke exposure in a new in vivo model of pulmonary oxidative stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**: L412–417.

Cazzola, M., and Donner, C.F. (2000) Long-acting beta2 agonists in the management of stable chronic obstructive pulmonary disease. *Drugs* **60**: 307–320.

Ceru, S., Konjar, S., Maher, K., Repnik, U., Krizaj, I., Bencina, M., *et al.* (2010) Stefin B interacts with histones and cathepsin L in the nucleus. *J Biol Chem* **285**: 10078–10086.

Česen, M.H., Pegan, K., Spes, A., and Turk, B. (2012) Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications. *Exp Cell Res* **318**: 1245–1251.

Chaly, Y.V., Paleolog, E.M., Kolesnikova, T.S., Tikhonov, I.I., Petratchenko, E.V., and Voitenok, N.N. (2000) Neutrophil alpha-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells. *Eur Cytokine Netw* **11**: 257–266.

Chang, J.C., Lesser, M., Yoo, O.H., and Orłowski, M. (1986) Increased cathepsin B-like activity in alveolar macrophages and bronchoalveolar lavage fluid from smokers. *Am Rev Respir Dis* **134**: 538–541.

Chan, L.L.Y., Cheung, B.K.W., Li, J.C.B., and 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., Munger, J.S., and Shi, G.P. (1994) The role of thiol proteases in tissue injury and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* **150**: S155–159.

Chapman, H.A., Riese, R.J., and Shi, G.P. (1997) Emerging roles for cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* **59**: 63–88.

Chen, C.I.-U., Schaller-Bals, S., Paul, K.P., Wahn, U., and Bals, R. (2004) β -defensins and LL-37 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* **3**: 45–50.

Cheng, T., Hitomi, K., Vlijmen-Willems, I.M.J.J. van, Jongh, G.J. de, Yamamoto, K., Nishi, K., *et al.* (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.

Chen, H., Xu, Z., Peng, L., Fang, X., Yin, X., Xu, N., and Cen, P. (2006) Recent advances in the research and development of human defensins. *Peptides* **27**: 931–940.

Chin, C.L., Manzel, L.J., Lehman, E.E., Humlicek, A.L., Shi, L., Starner, T.D., *et al.* (2005) Haemophilus influenzae from patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation induce more inflammation than colonizers. *Am J Respir Crit Care Med* **172**: 85–91.

Choe, Y., Leonetti, F., Greenbaum, D.C., Lecaille, F., Bogyo, M., Brömme, D., *et al.* (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., *et al.* (2002) Design of Noncovalent Inhibitors of Human Cathepsin L. From the 96-Residue Proregion to Optimized Tripeptides. *J Med Chem* **45**: 5321–5329.

Churg, A., Wang, R.D., Tai, H., Wang, X., Xie, C., Dai, J., *et al.* (2003) Macrophage metalloelastase mediates acute cigarette smoke-induced inflammation via tumor necrosis factor-alpha release. *Am J Respir Crit Care Med* **167**: 1083–1089.

Churg, A., Wang, R., Wang, X., Onnervik, P.-O., Thim, K., and Wright, J.L. (2007) Effect of an MMP-9/MMP-12 inhibitor on smoke-induced emphysema and airway remodelling in guinea pigs. *Thorax* **62**: 706–713.

Colman, R.W., Jameson, B.A., Lin, Y., Johnson, D., and 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.

Cooley, J., McDonald, B., Accurso, F.J., Crouch, E.C., and Remold-O'Donnell, E. (2008) Patterns of neutrophil serine protease-dependent cleavage of surfactant protein D in inflammatory lung disease. *J Leukoc Biol* **83**: 946–955.

Cooley, J., Takayama, T.K., Shapiro, S.D., Schechter, N.M., and Remold-O'Donnell, E. (2001) The serpin MNEI inhibits elastase-like and chymotrypsin-like serine proteases through efficient reactions at two active sites. *Biochemistry* **40**: 15762–15770.

Costa, M.G.S., Batista, P.R., Shida, C.S., Robert, C.H., Bisch, P.M., and Pascutti, P.G. (2010) How does heparin prevent the pH inactivation of cathepsin B? Allosteric mechanism elucidated by docking and molecular dynamics. *BMC Genomics* **11 Suppl 5**: S5.

Coulombe, R., Grochulski, P., Sivaraman, J., Ménard, R., Mort, J.S., and Cygler, M. (1996) Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *EMBO J* **15**: 5492–5503.

Cowland, J.B., Johnsen, A.H., and Borregaard, N. (1995) hCAP-18, a cathelin/pro-bactenecin-like protein of human neutrophil specific granules. *FEBS Lett* **368**: 173–176.

Cross, C.E., Vliet, A. van der, O'Neill, C.A., Louie, S., and Halliwell, B. (1994) Oxidants, antioxidants, and respiratory tract lining fluids. *Environ Health Perspect* **102 Suppl 10**: 185–191.

Crouch, E.C. (1998) Collectins and pulmonary host defense. *Am J Respir Cell Mol Biol* **19**: 177–201.

Crouch, E., and Wright, J.R. (2001) Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense. *Annu Rev Physiol* **63**: 521–554.

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

D

Daher, K.A., Selsted, M.E., and Lehrer, R.I. (1986) Direct inactivation of viruses by human granulocyte defensins. *J Virol* **60**: 1068–1074.

Dahl, R., Titlestad, I., Lindqvist, A., Wielders, P., Wray, H., Wang, M., *et al.* (2012) Effects of an oral MMP-9 and -12 inhibitor, AZD1236, on biomarkers in moderate/severe COPD: a randomised controlled trial. *Pulm Pharmacol Ther* **25**: 169–177.

- Dahl, S.W., Halkier, T., Lauritzen, C., Dolenc, I., Pedersen, J., Turk, V., and 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.
- Dajani, R., Zhang, Y., Taft, P.J., Travis, S.M., Starner, T.D., Olsen, A., *et al.* (2005) Lysozyme secretion by submucosal glands protects the airway from bacterial infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* **32**: 548–552.
- Dehrmann, F.M., Coetzer, T.H., Pike, R.N., and Dennison, C. (1995) Mature cathepsin L is substantially active in the ionic milieu of the extracellular medium. *Arch Biochem Biophys* **324**: 93–98.
- Dehrmann, F.M., Elliott, E., and 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.
- Deussing, J., Roth, W., Saftig, P., Peters, C., Ploegh, H.L., and Villadangos, J.A. (1998) Cathepsins B and D are dispensable for major histocompatibility complex class II-mediated antigen presentation. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 4516–4521.
- Diamond, G., Beckloff, N., Weinberg, A., and Kisich, K.O. (2009) The roles of antimicrobial peptides in innate host defense. *Curr Pharm Des* **15**: 2377–2392.
- Ding, A., Thieblemont, N., Zhu, J., Jin, F., Zhang, J., and Wright, S. (1999) Secretory leukocyte protease inhibitor interferes with uptake of lipopolysaccharide by macrophages. *Infect Immun* **67**: 4485–4489.
- Donaldson, S.H., Bennett, W.D., Zeman, K.L., Knowles, M.R., Tarran, R., and Boucher, R.C. (2006) Mucus clearance and lung function in cystic fibrosis with hypertonic saline. *N Engl J Med* **354**: 241–250.
- Dooley, M.M., and Pryor, W.A. (1982) Free radical pathology: inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor by products from the reaction of nitrogen dioxide with hydrogen peroxide and the etiology of emphysema. *Biochem Biophys Res Commun* **106**: 981–987.
- Doumas, S., Kolokotronis, A., and Stefanopoulos, P. (2005) Anti-inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor. *Infect Immun* **73**: 1271–1274.
- Dreymueller, D., Uhlig, S., and Ludwig, A. (2015) ADAM-family metalloproteinases in lung inflammation: potential therapeutic targets. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **308**: L325–343.
- Droga-Mazovec, G., Bojic, L., Petelin, A., Ivanova, S., Romih, R., Repnik, U., *et al.* (2008) Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues. *J Biol Chem* **283**: 19140–19150.
- Dubin, R.F., Robinson, S.K., and Widdicombe, J.H. (2004) Secretion of lactoferrin and lysozyme by cultures of human airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**: L750–755.
- Dulkerian, S.J., Gonzales, L.W., Ning, Y., and Ballard, P.L. (1996) Regulation of surfactant protein D in human fetal lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* **15**: 781–786.

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

Dunsche, A., Açı, Y., Siebert, R., Harder, J., Schröder, J.M., and Jepsen, S. (2001) Expression profile of human defensins and antimicrobial proteins in oral tissues. *J Oral Pathol Med* **30**: 154–158.

Du, X., Chen, N.L.H., Wong, A., Craik, C.S., and Brömme, D. (2013) Elastin degradation by cathepsin V requires two exosites. *J Biol Chem* **288**: 34871–34881.

E

Ehrenstein, G., and Lecar, H. (1977) Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q Rev Biophys* **10**: 1–34.

Elkins, M.R., Robinson, M., Rose, B.R., Harbour, C., Moriarty, C.P., Marks, G.B., *et al.* (2006) A controlled trial of long-term inhaled hypertonic saline in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* **354**: 229–240.

Ellison, R.T., and Giehl, T.J. (1991) Killing of gram-negative bacteria by lactoferrin and lysozyme. *J Clin Invest* **88**: 1080–1091.

Ellison, R.T., Giehl, T.J., and LaForce, F.M. (1988) Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect Immun* **56**: 2774–2781.

Elsbach, P. (1998) The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in antibacterial host defense. *J Leukoc Biol* **64**: 14–18.

Elsbach, P., and Weiss, J. (1998) Role of the bactericidal/permeability-increasing protein in host defence. *Curr Opin Immunol* **10**: 45–49.

Elssner, A., Duncan, M., Gavrilin, M., and Wewers, M.D. (2004) A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. *J Immunol* **172**: 4987–4994.

Esnard, F., and 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., *et al.* (1994) Cysteine proteinase inhibitors decrease articular cartilage and bone destruction in chronic inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* **37**: 236–247.

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

F

- Fairhead, M., Kelly, S.M., and Walle, C.F. van der (2008) A heparin binding motif on the pro-domain of human procathepsin L mediates zymogen destabilization and activation. *Biochem Biophys Res Commun* **366**: 862–867.
- Faiz, A., Tjin, G., Harkness, L., Weckmann, M., Bao, S., Black, J.L., *et al.* (2013) The expression and activity of cathepsins D, H and K in asthmatic airways. *PloS One* **8**: e57245.
- Falgueyret, J.P., Oballa, R.M., Okamoto, O., Wesolowski, G., Aubin, Y., Rydzewski, R.M., *et al.* (2001) Novel, nonpeptidic cyanamides as potent and reversible inhibitors of human cathepsins K and L. *J Med Chem* **44**: 94–104.
- Fischer, B., Voynow, J., and Ghio, A. (2015) COPD: balancing oxidants and antioxidants. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 261.
- Fleming, A. (1922) On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions. *Proc R Soc B Biol Sci* **93**: 306–317.
- Fletcher, M.J., Upton, J., Taylor-Fishwick, J., Buist, S.A., Jenkins, C., Hutton, J., *et al.* (2011) COPD uncovered: an international survey on the impact of chronic obstructive pulmonary disease [COPD] on a working age population. *BMC Public Health* **11**: 612.
- Foghsgaard, L., Wissing, D., Mauch, D., Lademann, U., Bastholm, L., Boes, M., *et al.* (2001) Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol* **153**: 999–1010.
- Fonović, M., and Turk, B. (2014) Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation. *Biochim Biophys Acta* **1840**: 2560–2570.
- Fox, T., Miguel, E. de, Mort, J.S., and Storer, A.C. (1992) Potent slow-binding inhibition of cathepsin B by its propeptide. *Biochemistry* **31**: 12571–12576.
- Frick, I.-M., Akesson, P., Herwald, H., Mörgelin, M., Malmsten, M., Nägler, D.K., and Björck, L. (2006) The contact system--a novel branch of innate immunity generating antibacterial peptides. *EMBO J* **25**: 5569–5578.
- Frizler, M., Stirnberg, M., Sisay, M.T., and Gütschow, M. (2010) Development of nitrile-based peptidic inhibitors of cysteine cathepsins. *Curr Top Med Chem* **10**: 294–322.
- Frizzell, R.A., and Hanrahan, J.W. (2012) Physiology of epithelial chloride and fluid secretion. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: a009563.
- Frye, M., Bargon, J., Dauletbaev, N., Weber, A., Wagner, T.O., and Gropp, R. (2000) Expression of human alpha-defensin 5 (HD5) mRNA in nasal and bronchial epithelial cells. *J Clin Pathol* **53**: 770–773.
- Fuchs, H.J., Borowitz, D.S., Christiansen, D.H., Morris, E.M., Nash, M.L., Ramsey, B.W., *et al.* (1994) Effect of aerosolized recombinant human DNase on exacerbations of respiratory symptoms and on pulmonary function in patients with cystic fibrosis. The Pulmozyme Study Group. *N Engl J Med* **331**: 637–642.

Fujita, M., Shannon, J.M., Ouchi, H., Voelker, D.R., Nakanishi, Y., and Mason, R.J. (2005) Serum surfactant protein D is increased in acute and chronic inflammation in mice. *Cytokine* **31**: 25–33.

Funkelstein, L., and Hook, V. (2011) The novel role of cathepsin L for neuropeptide production illustrated by research strategies in chemical biology with protease gene knockout and expression. *Methods Mol Biol* **768**: 107–125.

G

Gaggar, A., Hector, A., Bratcher, P.E., Mall, M.A., Griesse, M., and Hartl, D. (2011) The role of matrix metalloproteinases in cystic fibrosis lung disease. *Eur Respir J* **38**: 721–727.

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

Ganz, T. (2002) Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J Clin Invest* **109**: 693–697.

Ganz, T. (2003) Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **3**: 710–720.

Ganz, T. (2004) Antimicrobial polypeptides. *J Leukoc Biol* **75**: 34–38.

Ganz, T., and Lehrer, R.I. (1998) Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol* **10**: 41–44.

Ganz, T., Selsted, M.E., and Lehrer, R.I. (1990) Defensins. *Eur J Haematol* **44**: 1–8.

Ganz, T., Selsted, M.E., Szklarek, D., Harwig, S.S., Daher, K., Bainton, D.F., and Lehrer, R.I. (1985) Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J Clin Invest* **76**: 1427–1435.

Gao, W., Li, L., Wang, Y., Zhang, S., Adcock, I.M., Barnes, P.J., *et al.* (2015) Bronchial epithelial cells: The key effector cells in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease? *Respirol Carlton Vic* **20**: 722–729.

Garcia-Verdugo, I., Descamps, D., Chignard, M., Touqui, L., and Sallenave, J.-M. (2010) Lung protease/anti-protease network and modulation of mucus production and surfactant activity. *Biochimie* **92**: 1608–1617.

García-Verdugo, I., Sánchez-Barbero, F., Soldau, K., Tobias, P.S., and Casals, C. (2005) Interaction of SP-A (surfactant protein A) with bacterial rough lipopolysaccharide (Re-LPS), and effects of SP-A on the binding of Re-LPS to CD14 and LPS-binding protein. *Biochem J* **391**: 115–124.

Gardai, S.J., Xiao, Y.-Q., Dickinson, M., Nick, J.A., Voelker, D.R., Greene, K.E., and Henson, P.M. (2003) By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation. *Cell* **115**: 13–23.

- Garnero, P., Borel, O., Byrjalsen, I., Ferreras, M., Drake, F.H., McQueney, M.S., *et al.* (1998) The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. *J Biol Chem* **273**: 32347–32352.
- Gazit, E., Boman, A., Boman, H.G., and Shai, Y. (1995) Interaction of the mammalian antibacterial peptide cecropin P1 with phospholipid vesicles. *Biochemistry* **34**: 11479–11488.
- Gelb, B.D., Shi, G.P., Chapman, H.A., and Desnick, R.J. (1996) Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science* **273**: 1236–1238.
- Geraghty, P., Greene, C.M., O'Mahony, M., O'Neill, S.J., Taggart, C.C., and McElvaney, N.G. (2007) Secretory leucocyte protease inhibitor inhibits interferon-gamma-induced cathepsin S expression. *J Biol Chem* **282**: 33389–33395.
- Geraghty, P., Rogan, M.P., Greene, C.M., Boxio, R.M.M., Poiriert, T., O'Mahony, M., *et al.* (2007) Neutrophil elastase up-regulates cathepsin B and matrix metalloprotease-2 expression. *J Immunol* **178**: 5871–5878.
- Geraghty, P., Rogan, M.P., Greene, C.M., Brantly, M.L., O'Neill, S.J., Taggart, C.C., and McElvaney, N.G. (2008) Alpha-1-antitrypsin aerosolised augmentation abrogates neutrophil elastase-induced expression of cathepsin B and matrix metalloprotease 2 in vivo and in vitro. *Thorax* **63**: 621–626.
- Gerson, C., Sabater, J., Scuri, M., Torbati, A., Coffey, R., Abraham, J.W., *et al.* (2000) The lactoperoxidase system functions in bacterial clearance of airways. *Am J Respir Cell Mol Biol* **22**: 665–671.
- Gillet, L., Roger, S., Besson, P., Lecaille, F., Gore, J., Bougnoux, P., *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.
- Gocheva, V., Chen, X., Peters, C., Reinheckel, T., and Joyce, J.A. (2010) Deletion of cathepsin H perturbs angiogenic switching, vascularization and growth of tumors in a mouse model of pancreatic islet cell cancer. *Biol Chem* **391**: 937–945.
- Gocheva, V., and Joyce, J.A. (2007) Cysteine cathepsins and the cutting edge of cancer invasion. *Cell Cycle Georget Tex* **6**: 60–64.
- Gocheva, V., Zeng, W., Ke, D., Klimstra, D., Reinheckel, T., Peters, C., *et al.* (2006) Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis. *Genes Dev* **20**: 543–556.
- Godat, E., Hervé-Grépinet, V., Veillard, F., Lecaille, F., Belghazi, M., Brömme, D., and Lalmanach, G. (2008) Regulation of cathepsin K activity by hydrogen peroxide. *Biol Chem* **389**: 1123–1126.
- Goldman, M.J., Anderson, G.M., Stolzenberg, E.D., Kari, U.P., Zasloff, M., and Wilson, J.M. (1997) Human β -Defensin-1 Is a Salt-Sensitive Antibiotic in Lung That Is Inactivated in Cystic Fibrosis. *Cell* **88**: 553–560.
- Golec, M., Reichel, C., Lemieszek, M., Mackiewicz, B., Buczkowski, J., Sitkowska, J., *et al.* (2012) Cathelicidin LL-37 in bronchoalveolar lavage and epithelial lining fluids from COPD patients and healthy individuals. *J Biol Regul Homeost Agents* **26**: 617–625.

- Golovatch, P., Mercer, B.A., Lemaître, V., Wallace, A., Foronjy, R.F., and Armiento, J. D' (2009) Role for cathepsin K in emphysema in smoke-exposed guinea pigs. *Exp Lung Res* **35**: 631–645.
- Gombart, A.F. (2009) The vitamin D-antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection. *Future Microbiol* **4**: 1151–1165.
- Gompertz, S., O'Brien, C., Bayley, D.L., Hill, S.L., and Stockley, R.A. (2001) Changes in bronchial inflammation during acute exacerbations of chronic bronchitis. *Eur Respir J* **17**: 1112–1119.
- Gong, Q., Chan, S.J., Bajkowski, A.S., Steiner, D.F., and 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.
- Goulet, B., Baruch, A., Moon, N.-S., Poirier, M., Sansregret, L.L., Erickson, A., *et al.* (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.
- Greenbaum, L.M., and Fruton, J.S. (1957) Purification and properties of beef spleen cathepsin B. *J Biol Chem* **226**: 173–180.
- Greene, C.M., McElvaney, N.G., O'Neill, S.J., and Taggart, C.C. (2004) Secretory leucoprotease inhibitor impairs Toll-like receptor 2- and 4-mediated responses in monocytic cells. *Infect Immun* **72**: 3684–3687.
- Griese, 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.
- Griese, M., Wiesener, A., Lottspeich, F., and Bredow, C. von (2003) Limited proteolysis of surfactant protein D causes a loss of its calcium-dependent lectin functions. *Biochim Biophys Acta* **1638**: 157–163.
- Grigat, J., Soruri, A., Forssmann, U., Riggert, J., and Zwirner, J. (2007) Chemoattraction of macrophages, T lymphocytes, and mast cells is evolutionarily conserved within the human alpha-defensin family. *J Immunol* **179**: 3958–3965.
- Grubb, A., Abrahamson, M., Olafsson, I., Trojnar, J., Kasprzykowska, R., Kasprzykowski, F., and Grzonka, Z. (1990) Synthesis of cysteine proteinase inhibitors structurally based on the proteinase interacting N-terminal region of human cystatin C. *Biol Chem Hoppe Seyler* **371 Suppl**: 137–144.
- Guay, J., Falgout, J.P., Ducret, A., Percival, M.D., and Mancini, J.A. (2000) Potency and selectivity of inhibition of cathepsin K, L and S by their respective propeptides. *Eur J Biochem FEBS* **267**: 6311–6318.
- Guicciardi, M.E., Deussing, J., Miyoshi, H., Bronk, S.F., Svingen, P.A., Peters, C., *et al.* (2000) Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* **106**: 1127–1137.

Guina, T., Yi, E.C., Wang, H., Hackett, M., and Miller, S.I. (2000) A PhoP-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar typhimurium promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. *J Bacteriol* **182**: 4077–4086.

Guinec, N., Dalet-Fumeron, V., and 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., and 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. *Struct Lond Engl* **1993** **6**: 51–61.

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

Gutmann, H.R., and 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., and 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.

Guyot, N., Butler, M.W., McNally, P., Weldon, S., Greene, C.M., Levine, R.L., *et al.* (2008) Elafin, an elastase-specific inhibitor, is cleaved by its cognate enzyme neutrophil elastase in sputum from individuals with cystic fibrosis. *J Biol Chem* **283**: 32377–32385.

Guyot, N., Zani, M.-L., Berger, P., Dallet-Choisy, S., and Moreau, T. (2005) Proteolytic susceptibility of the serine protease inhibitor trappin-2 (pre-elafin): evidence for tryptase-mediated generation of elafin. *Biol Chem* **386**: 391–399.

H

Haagsman, H.P., Hawgood, S., Sargeant, T., Buckley, D., White, R.T., Drickamer, K., and Benson, B.J. (1987) The major lung surfactant protein, SP 28-36, is a calcium-dependent, carbohydrate-binding protein. *J Biol Chem* **262**: 13877–13880.

Haddad, I.Y., Zhu, S., Ischiropoulos, H., and Matalon, S. (1996) Nitration of surfactant protein A results in decreased ability to aggregate lipids. *Am J Physiol* **270**: L281–288.

Halangk, W., Lerch, M.M., Brandt-Nedele, B., Roth, W., Ruthenbueger, M., Reinheckel, T., *et al.* (2000) Role of cathepsin B in intracellular trypsinogen activation and the onset of acute pancreatitis. *J Clin Invest* **106**: 773–781.

Hancock, R.E. (2001) Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis* **1**: 156–164.

Hancock, R.E.W., Nijnik, A., and Philpott, D.J. (2012) Modulating immunity as a therapy for bacterial infections. *Nat Rev Microbiol* **10**: 243–254.

- Hancock, R.E.W., and Sahl, H.-G. (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* **24**: 1551–1557.
- Han, J., Luo, T., Gu, Y., Li, G., Jia, W., and Luo, M. (2009) Cathepsin K regulates adipocyte differentiation: possible involvement of type I collagen degradation. *Endocr J* **56**: 55–63.
- Hankiewicz, J., and Swierczek, E. (1974) Lysozyme in human body fluids. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* **57**: 205–209.
- Harbitz, O., Jenssen, A.O., and Smidsrød, O. (1984) Lysozyme and lactoferrin in sputum from patients with chronic obstructive lung disease. *Eur J Respir Dis* **65**: 512–520.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., and Schröder, J.M. (1997) A peptide antibiotic from human skin. *Nature* **387**: 861.
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., and Schroder, J.M. (2001) Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* **276**: 5707–5713.
- Harder, J., Siebert, R., Zhang, Y., Matthiesen, P., Christophers, E., Schlegelberger, B., and Schröder, J.M. (1997) Mapping of the gene encoding human beta-defensin-2 (DEFB2) to chromosome region 8p22-p23.1. *Genomics* **46**: 472–475.
- Harth, G., Andrews, N., Mills, A.A., Engel, J.C., Smith, R., and McKerrow, J.H. (1993) Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **58**: 17–24.
- Hartl, D., Gaggar, A., Bruscia, E., Hector, A., Marcos, V., Jung, A., *et al.* (2012) Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros Off J Eur Cyst Fibros Soc* **11**: 363–382.
- Harwig, S.S., Ganz, T., and Lehrer, R.I. (1994) Neutrophil defensins: purification, characterization, and antimicrobial testing. *Methods Enzymol* **236**: 160–172.
- Hashimoto, Y., Kakegawa, H., Narita, Y., Hachiya, Y., Hayakawa, T., Kos, J., *et al.* (2001) Significance of cathepsin B accumulation in synovial fluid of rheumatoid arthritis. *Biochem Biophys Res Commun* **283**: 334–339.
- Heinzel-Wieland, R., Steffens, G.J., and Flohé, L. (1991) Inhibitory characteristics and oxidant resistance of site specific variants of recombinant human antileukoproteinase (ALP). *Biomed Biochim Acta* **50**: 677–681.
- Henderson, A.G., Ehre, C., Button, B., Abdullah, L.H., Cai, L.-H., Leigh, M.W., *et al.* (2014) Cystic fibrosis airway secretions exhibit mucin hyperconcentration and increased osmotic pressure. *J Clin Invest* **124**: 3047–3060.
- Henskens, Y.M., Veerman, E.C., and Nieuw Amerongen, A.V. (1996) Cystatins in health and disease. *Biol Chem Hoppe Seyler* **377**: 71–86.
- Herr, C., Beisswenger, C., Hess, C., Kandler, K., Suttorp, N., Welte, T., *et al.* (2009) Suppression of pulmonary innate host defence in smokers. *Thorax* **64**: 144–149.

- Herr, C., Han, G., Li, D., Tschernig, T., Dinh, Q.T., Beißwenger, C., and Bals, R. (2015) Combined exposure to bacteria and cigarette smoke resembles characteristic phenotypes of human COPD in a murine disease model. *Exp Toxicol Pathol* **67**: 261–269.
- Herr, C., Shaykhiev, R., and Bals, R. (2007) The role of cathelicidin and defensins in pulmonary inflammatory diseases. *Expert Opin Biol Ther* **7**: 1449–1461.
- Hervé-Grépinet, V., Veillard, F., Godat, E., Heuzé-Vourc'h, N., Lecaille, F., and Lalmanach, G. (2008) Extracellular catalase activity protects cysteine cathepsins from inactivation by hydrogen peroxide. *FEBS Lett* **582**: 1307–1312.
- Hiemstra, P.S. (2002) Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation. *Biochem Soc Trans* **30**: 116–120.
- Hiemstra, P.S., Maassen, R.J., Stolk, J., Heinzl-Wieland, R., Steffens, G.J., and Dijkman, J.H. (1996) Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect Immun* **64**: 4520–4524.
- Higashiyama, S., Ohkubo, I., Ishiguro, H., Sasaki, M., Matsuda, T., and Nakamura, R. (1987) Heavy chain of human high molecular weight and low molecular weight kininogens binds calcium ion. *Biochemistry* **26**: 7450–7458.
- Hill, A.T., Campbell, E.J., Hill, S.L., Bayley, D.L., and Stockley, R.A. (2000) Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *Am J Med* **109**: 288–295.
- Hirche, T.O., Crouch, E.C., Espinola, M., Brokelman, T.J., Mecham, R.P., DeSilva, N., *et al.* (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.
- Hirota, J.A., and Knight, D.A. (2012) Human airway epithelial cell innate immunity: relevance to asthma. *Curr Opin Immunol* **24**: 740–746.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., and Ezekowitz, R.A.B. (1999) Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science* **284**: 1313–1318.
- Høiby, N., and Koch, C. (1990) Cystic fibrosis. 1. *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis and its management. *Thorax* **45**: 881–884.
- Honey, K., and Rudensky, A.Y. (2003) Lysosomal cysteine proteases regulate antigen presentation. *Nat Rev Immunol* **3**: 472–482.
- Hook, V., Schechter, I., Demuth, H.-U., and Hook, G. (2008) Alternative pathways for production of beta-amyloid peptides of Alzheimer's disease. *Biol Chem* **389**: 993–1006.
- Hook, V., Toneff, T., Bogyo, M., Greenbaum, D., Medzihradszky, K.F., Neveu, J., *et al.* (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.
- Hoover, D.M., Boulegue, C., Yang, D., Oppenheim, J.J., Tucker, K., Lu, W., and Lubkowski, J. (2002) The structure of human macrophage inflammatory protein-3alpha /CCL20. Linking

antimicrobial and CC chemokine receptor-6-binding activities with human beta-defensins. *J Biol Chem* **277**: 37647–37654.

Hoover, D.M., Rajashankar, K.R., Blumenthal, R., Puri, A., Oppenheim, J.J., Chertov, O., and Lubkowski, J. (2000) The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *J Biol Chem* **275**: 32911–32918.

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

Hou, W.S., Li, Z., Gordon, R.E., Chan, K., Klein, M.J., Levy, R., *et al.* (2001) Cathepsin k is a critical protease in synovial fibroblast-mediated collagen degradation. *Am J Pathol* **159**: 2167–2177.

Hubbard, R.C., Ogushi, F., Fells, G.A., Cantin, A.M., Jallat, S., Courtney, M., and Crystal, R.G. (1987) Oxidants spontaneously released by alveolar macrophages of cigarette smokers can inactivate the active site of alpha 1-antitrypsin, rendering it ineffective as an inhibitor of neutrophil elastase. *J Clin Invest* **80**: 1289–1295.

Hudson, N.W., and 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.

Hwang, S.-R., Stoka, V., Turk, V., and Hook, V.Y.H. (2005) The novel bovine serpin endopin 2C demonstrates selective inhibition of the cysteine protease cathepsin L compared to the serine protease elastase, in cross-class inhibition. *Biochemistry* **44**: 7757–7767.

I

Ikegami, M., Whitsett, J.A., Chroneos, Z.C., Ross, G.F., Reed, J.A., Bachurski, C.J., and Jobe, A.H. (2000) IL-4 increases surfactant and regulates metabolism in vivo. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **278**: L75–80.

Illy, C., Quraishi, O., Wang, J., Purisima, E., Vernet, T., and Mort, J.S. (1997) Role of the occluding loop in cathepsin B activity. *J Biol Chem* **272**: 1197–1202.

Iqbal, S.M., Ball, T.B., Levinson, P., Maranan, L., Jaoko, W., Wachihi, C., *et al.* (2009) Elevated elafin/trappin-2 in the female genital tract is associated with protection against HIV acquisition. *AIDS Lond Engl* **23**: 1669–1677.

Isemura, S., Saitoh, E., Sanada, K., and Minakata, K. (1991) Identification of full-sized forms of salivary (S-type) cystatins (cystatin SN, cystatin SA, cystatin S, and two phosphorylated forms of cystatin S) in human whole saliva and determination of phosphorylation sites of cystatin S. *J Biochem (Tokyo)* **110**: 648–654.

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

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

Ishikawa, N., Hattori, N., Tanaka, S., Horimasu, Y., Haruta, Y., Yokoyama, A., *et al.* (2011) Levels of surfactant proteins A and D and KL-6 are elevated in the induced sputum of chronic obstructive pulmonary disease patients: a sequential sputum analysis. *Respir Int Rev Thorac Dis* **82**: 10–18.

Ivanova, S., Gregorc, U., Vidergar, N., Javier, R., Brecht, D.S., Vandenabeele, P., *et al.* (2011) MAGUKs, scaffolding proteins at cell junctions, are substrates of different proteases during apoptosis. *Cell Death Dis* **2**: e116.

J

Jaques, A., Daviskas, E., Turton, J.A., McKay, K., Cooper, P., Stirling, R.G., *et al.* (2008) Inhaled mannitol improves lung function in cystic fibrosis. *Chest* **133**: 1388–1396.

Jarczák, J., Kościuczek, E.M., Lisowski, P., Strzałkowska, N., Jóźwik, A., Horbańczuk, J., *et al.* (2013) Defensins: Natural component of human innate immunity. *Hum Immunol* **74**: 1069–1079.

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

Jenssen, H., Hamill, P., and Hancock, R.E.W. (2006) Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* **19**: 491–511.

Jenssen, H., and Hancock, R.E.W. (2009) Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie* **91**: 19–29.

Jiang, Y.-Y., Xiao, W., Zhu, M.-X., Yang, Z.-H., Pan, X.-J., Zhang, Y., *et al.* (2012) The effect of human antibacterial peptide LL-37 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* **106**: 1680–1689.

Johansson, J., Gudmundsson, G.H., Rottenberg, M.E., Berndt, K.D., and Agerberth, B. (1998) Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J Biol Chem* **273**: 3718–3724.

Jo, H., Meinhardt, N., Wu, Y., Kulkarni, S., Hu, X., Low, K.E., *et al.* (2012) Development of α -Helical Calpain Probes by Mimicking a Natural Protein–Protein Interaction. *J Am Chem Soc* **134**: 17704–17713.

Johnson, D.A. (1987) Effects of ozone and nitrogen dioxide on human lung proteinase inhibitors. *Res Rep Health Eff Inst* **5**: 5–25.

Johnson, D.A., Barrett, A.J., and Mason, R.W. (1986) Cathepsin L inactivates alpha 1-proteinase inhibitor by cleavage in the reactive site region. *J Biol Chem* **261**: 14748–14751.

Johnson, L.N., and Phillips, D.C. (1965) Structure of some crystalline lysozyme-inhibitor complexes determined by X-ray analysis at 6 Angstrom resolution. *Nature* **206**: 761–763.

Jonard, L., Banh, L., Pressac, M., Just, J., and Bahuau, M. (2006) Les défensines en physiopathologie humaine. *Immuno-Anal Biol Spéc* **21**: 342–347.

Jones, D.E., and Bevins, C.L. (1992) Paneth cells of the human small intestine express an antimicrobial peptide gene. *J Biol Chem* **267**: 23216–23225.

Joos, G.F. (2010) Potential for long-acting muscarinic antagonists in chronic obstructive pulmonary disease. *Expert Opin Investig Drugs* **19**: 257–264.

Jordans, S., Jenko-Kokalj, S., Kuhl, N., Tedelind, S., Sendt, W., Bromme, D., *et al.* (2009) Monitoring compartment-specific substrate cleavage by cathepsins B, K, L, and S at physiological pH and redox conditions. *BMC Biochem* **10**: 23.

Jorenby, D.E., Leischow, S.J., Nides, M.A., Rennard, S.I., Johnston, J.A., Hughes, A.R., *et al.* (1999) A controlled trial of sustained-release bupropion, a nicotine patch, or both for smoking cessation. *N Engl J Med* **340**: 685–691.

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

K

Kafienah, W., Brömme, D., Buttle, D.J., Croucher, L.J., and 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, B.L., Selsted, M.E., Ganz, T., and Lehrer, R.I. (1990) Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci* **87**: 210–214.

Kang, M.-J., Homer, R.J., Gallo, A., Lee, C.G., Crothers, K.A., Cho, S.J., *et al.* (2007) 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* **178**: 1948–1959.

Kantyka, T., Pyrc, K., Gruca, M., Smagur, J., Plaza, K., Guzik, K., *et al.* (2013) Staphylococcus aureus proteases degrade lung surfactant protein A potentially impairing innate immunity of the lung. *J Innate Immun* **5**: 251–260.

Kaplan, J., and 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., and DiTomas, M.E. (1993) Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proc Natl Acad Sci* **90**: 3063–3067.

Kasabova, M., Joulin-Giet, A., Lecaille, F., Gilmore, B.F., Marchand-Adam, S., Saidi, A., and Lalmanach, G. (2014) Regulation of TGF- β 1-driven Differentiation of Human Lung Fibroblasts: EMERGING ROLES OF CATHEPSIN B AND CYSTATIN C. *J Biol Chem* **289**: 16239–16251.

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.

Kato, H., Nagasawa, S., and Iwanaga, S. (1981) HMW and LMW kininogens. *Methods Enzymol* **80 Pt C**: 172–198.

Katunuma, N. (2010) Posttranslational processing and modification of cathepsins and cystatins. *J Signal Transduct* **2010**: 375345.

Katunuma, N., Matsunaga, Y., Matsui, A., Kakegawa, H., Endo, K., Inubushi, T., *et al.* (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., *et al.* (1999) Structure based development of novel specific inhibitors for cathepsin L and cathepsin S in vitro and in vivo. *FEBS Lett* **458**: 6–10.

Kempson, G.E., Muir, H., Pollard, C., and 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., and Horsfield, P.H. (1976) The effects of proteolytic enzymes on the mechanical properties of adult human articular cartilage. *Biochim Biophys Acta* **428**: 741–760.

Kida, Y., Shimizu, T., and Kuwano, K. (2006) Sodium butyrate up-regulates cathelicidin gene expression via activator protein-1 and histone acetylation at the promoter region in a human lung epithelial cell line, EBC-1. *Mol Immunol* **43**: 1972–1981.

Kilsgård, O., Andersson, P., Malmsten, M., Nordin, S.L., Linge, H.M., Eliasson, M., *et al.* (2012) Peptidylarginine Deiminases Present in the Airways during Tobacco Smoking and Inflammation Can Citrullinate the Host Defense Peptide LL-37, Resulting in Altered Activities. *Am J Respir Cell Mol Biol* **46**: 240–248.

Kim, B.J., Rho, Y.K., Lee, H.I., Jeong, M.S., Li, K., Seo, S.J., *et al.* (2009) The effect of calcipotriol on the expression of human beta defensin-2 and LL-37 in cultured human keratinocytes. *Clin Dev Immunol* **2009**: 645898.

Kim, J.E., Kim, H.J., Choi, J.M., Lee, K.H., Kim, T.Y., Cho, B.K., *et al.* (2010) The antimicrobial peptide human cationic antimicrobial protein-18/cathelicidin LL-37 as a putative growth factor for malignant melanoma. *Br J Dermatol* **163**: 959–967.

Kim, V., and Criner, G.J. (2013) Chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **187**: 228–237.

Kindy, M.S., Yu, J., Zhu, H., Amouri, S.S. El-, Hook, V., and Hook, G.R. (2012) Deletion of the cathepsin B gene improves memory deficits in a transgenic Alzheimer's disease mouse model expressing A β PP containing the wild-type β -secretase site sequence. *J Alzheimers Dis JAD* **29**: 827–840.

Kirkham, P.A., Spooner, G., Ffoulkes-Jones, C., and Calvez, R. (2003) Cigarette smoke triggers macrophage adhesion and activation: role of lipid peroxidation products and scavenger receptor. *Free Radic Biol Med* **35**: 697–710.

- Kirkham, S., Sheehan, J.K., Knight, D., Richardson, P.S., and Thornton, D.J. (2002) Heterogeneity of airways mucus: variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B. *Biochem J* **361**: 537–546.
- Kirschke, H., Barrett, A.J., and Rawlings, N.D. (1995) Proteinases 1: lysosomal cysteine proteinases. *Protein Profile* **2**: 1581–1643.
- Kirschke, H., Langner, J., Wiederanders, B., Ansorge, S., Bohley, P., and Broghammer, U. (1976) [Intracellular protein breakdown. VII. Cathepsin L and H; two new proteinases from rat liver lysosomes]. *Acta Biol Med Ger* **35**: 285–299.
- Kirschke, H., Wiederanders, B., Brömme, D., and Rinne, A. (1989) Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochem J* **264**: 467–473.
- Kitamoto, S., Sukhova, G.K., Sun, J., Yang, M., Libby, P., Love, V., *et al.* (2007) Cathepsin L deficiency reduces diet-induced atherosclerosis in low-density lipoprotein receptor-knockout mice. *Circulation* **115**: 2065–2075.
- Kitamura, N., Kitagawa, H., Fukushima, D., Takagaki, Y., Miyata, T., and Nakanishi, S. (1985) Structural organization of the human kininogen gene and a model for its evolution. *J Biol Chem* **260**: 8610–8617.
- Klarić, M., Tao, S., Stoka, V., Turk, B., and Turk, V. (2009) Cysteine cathepsins are not critical for TNF-alpha-induced cell death in T98G and U937 cells. *Biochim Biophys Acta* **1794**: 1372–1377.
- Klockars, M., and Reitamo, S. (1975) Tissue distribution of lysozyme in man. *J Histochem Cytochem* **23**: 932–940.
- Koeffler, H.P., Reichel, H., Bishop, J.E., and Norman, A.W. (1985) gamma-Interferon stimulates production of 1,25-dihydroxyvitamin D3 by normal human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **127**: 596–603.
- Kontinen, Y.T., Mandelin, J., Li, T.-F., Salo, J., Lassus, J., Liljeström, M., *et al.* (2002) Acidic cysteine endoproteinase cathepsin K in the degeneration of the superficial articular hyaline cartilage in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* **46**: 953–960.
- 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.
- Kos, J., and 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.
- Kos, J., Sekirnik, A., Premzl, A., Zavasnik Bergant, V., Langerholc, T., Turk, B., *et al.* (2005) Carboxypeptidases cathepsins X and B display distinct protein profile in human cells and tissues. *Exp Cell Res* **306**: 103–113.
- Kostoulas, G., Lang, A., Nagase, H., and Baici, A. (1999) Stimulation of angiogenesis through cathepsin B inactivation of the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *FEBS Lett* **455**: 286–290.

Kouchi, I., Yasuoka, S., Ueda, Y., and Ogura, T. (1993) Analysis of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in bronchial secretions from patients with hypersecretory respiratory diseases. *Tokushima J Exp Med* **40**: 95–107.

Koval, M. (2013) Claudin Heterogeneity and Control of Lung Tight Junctions. *Annu Rev Physiol* **75**: 551–567.

Koziel, J., Bryzek, D., Sroka, A., Maresz, K., Glowczyk, I., Bielecka, E., *et al.* (2014) Citrullination alters immunomodulatory function of LL-37 essential for prevention of endotoxin-induced sepsis. *J Immunol* **192**: 5363–5372.

Kragol, G., Lovas, S., Varadi, G., Condie, B.A., Hoffmann, R., and Otvos, L. (2001) The antibacterial peptide pyrrolicin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry* **40**: 3016–3026.

Kruszewski, W.J., Rzepko, R., Wojtacki, J., Skokowski, J., Kopacz, A., Jaśkiewicz, K., and Drucis, K. (2004) Overexpression of cathepsin B correlates with angiogenesis in colon adenocarcinoma. *Neoplasia* **51**: 38–43.

Kuang, Z., Hao, Y., Walling, B.E., Jeffries, J.L., Ohman, D.E., and Lau, G.W. (2011) *Pseudomonas aeruginosa* elastase provides an escape from phagocytosis by degrading the pulmonary surfactant protein-A. *PLoS One* **6**: e27091.

Kuroki, Y., Takahashi, M., and Nishitani, C. (2007) Pulmonary collectins in innate immunity of the lung. *Cell Microbiol* **9**: 1871–1879.

L

Ladokhin, A.S., and White, S.H. (2001) “Detergent-like” permeabilization of anionic lipid vesicles by melittin. *Biochim Biophys Acta* **1514**: 253–260.

Laible, N.J., and Germaine, G.R. (1985) Bactericidal activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides. *Infect Immun* **48**: 720–728.

Lalmanach, G., Lecaille, F., Chagas, J.R., Authié, E., Scharfstein, J., Juliano, M.A., and Gauthier, F. (1998) Inhibition of trypanosomal cysteine proteinases by their propeptides. *J Biol Chem* **273**: 25112–25116.

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

Lalmanach, G., Saidi, A., Marchand-Adam, S., Lecaille, F., and Kasabova, M. (2015) Cysteine cathepsins and cystatins: from ancillary tasks to prominent status in lung diseases. *Biol Chem* **396**.

Laney, A.S., and Weissman, D.N. (2014) Respiratory diseases caused by coal mine dust. *J Occup Environ Med* **56 Suppl 10**: S18–22.

Laurell, C.-B., and Eriksson, S. (1963) The Electrophoretic α 1-Globulin Pattern of Serum in α 1-Antitrypsin Deficiency. *Scand J Clin Lab Invest* **15**: 132–140.

- Layton, G.T., Harris, S.J., Bland, F.A., Lee, S.R., Fearn, S., Kaleta, J., *et al.* (2001) Therapeutic effects of cysteine protease inhibition in allergic lung inflammation: inhibition of allergen-specific T lymphocyte migration. *Inflamm Res* **50**: 400–408.
- Lecaille, F., Brömme, D., and Lalmanach, G. (2008) Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity. *Biochimie* **90**: 208–226.
- Lecaille, F., Choe, Y., Brandt, W., Li, Z., Craik, C.S., and Brömme, D. (2002a) Selective inhibition of the collagenolytic activity of human cathepsin K by altering its S2 subsite specificity. *Biochemistry* **41**: 8447–8454.
- Lecaille, F., 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.
- Lecaille, F., Kaleta, J., and Brömme, D. (2002b) Human and Parasitic Papain-Like Cysteine Proteases: Their Role in Physiology and Pathology and Recent Developments in Inhibitor Design. *Chem Rev* **102**: 4459–4488.
- Lecaille, F., Lalmanach, G., and Andrault, P.-M. (2015) Antimicrobial Proteins and Peptides in Human Lung Diseases: A Friend and Foe Partnership with Host Proteases. *Biochimie* DOI : 10.1016/j.biochi.2015.08.014
- Lecaille, F., Naudin, C., Sage, J., Joulin-Giet, A., Courty, A., Andrault, P.-M., *et al.* (2013) Specific cleavage of the lung surfactant protein A by human cathepsin S may impair its antibacterial properties. *Int J Biochem Cell Biol* **45**: 1701–1709.
- 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.
- Lechner, A.M., Assfalg-Machleidt, I., Zahler, S., Stoeckelhuber, M., Machleidt, W., Jochum, M., and Nägler, D.K. (2006) RGD-dependent binding of procathepsin X to integrin alphavbeta3 mediates cell-adhesive properties. *J Biol Chem* **281**: 39588–39597.
- Lee, C.H., Igarashi, Y., Hohman, R.J., Kaulbach, H., White, M.V., and Kaliner, M.A. (1993) Distribution of secretory leukoprotease inhibitor in the human nasal airway. *Am Rev Respir Dis* **147**: 710–716.
- Lee, S.-H., Jun, H.-K., Lee, H.-R., Chung, C.-P., and Choi, B.-K. (2010) Antibacterial and lipopolysaccharide (LPS)-neutralising activity of human cationic antimicrobial peptides against periodontopathogens. *Int J Antimicrob Agents* **35**: 138–145.
- Lehrer, R.I., Barton, A., Daher, K.A., Harwig, S.S., Ganz, T., and Selsted, M.E. (1989) Interaction of human defensins with Escherichia coli. Mechanism of bactericidal activity. *J Clin Invest* **84**: 553–561.
- Lehrer, R.I., and Ganz, T. (1999) Antimicrobial peptides in mammalian and insect host defence. *Curr Opin Immunol* **11**: 23–27.
- Lehrer, R.I., and Ganz, T. (2002) Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol* **14**: 96–102.

- Leitch, E.C., and Willcox, M.D. (1999) Lactoferrin increases the susceptibility of *S. epidermidis* biofilms to lysozyme and vancomycin. *Curr Eye Res* **19**: 12–19.
- Lemaire, P.A., Huang, L., Zhuo, Y., Lu, J., Bahnck, C., Stachel, S.J., *et al.* (2014) Chondroitin Sulfate Promotes Activation of Cathepsin K. *J Biol Chem*.
- Lemaire, R., Huet, G., Zerimech, F., Grard, G., Fontaine, C., Duquesnoy, B., and 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.
- Lenander-Lumikari, M. (1992) Inhibition of *Candida albicans* by the Peroxidase/SCN-/H₂O₂ system. *Oral Microbiol Immunol* **7**: 315–320.
- Lenarcic, B., Krishnan, G., Borukhovich, R., Ruck, B., Turk, V., and 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.
- Lenarcic, B., Ritonja, A., Strukelj, B., Turk, B., and 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., and Turk, V. (1999) Thyroglobulin type-1 domains in equistatin inhibit both papain-like cysteine proteinases and cathepsin D. *J Biol Chem* **274**: 563–566.
- Levy, P.F., and Viljoen, M. (1995) Lactoferrin: a general review. *Haematologica* **80**: 252–267.
- Lim, B.L., Wang, J.Y., Holmskov, U., Hoppe, H.J., and Reid, K.B. (1994) Expression of the carbohydrate recognition domain of lung surfactant protein D and demonstration of its binding to lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. *Biochem Biophys Res Commun* **202**: 1674–1680.
- 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.
- Linke, M., Herzog, V., and Brix, K. (2002) Trafficking of lysosomal cathepsin B-green fluorescent protein to the surface of thyroid epithelial cells involves the endosomal/lysosomal compartment. *J Cell Sci* **115**: 4877–4889.
- Li, Q., and Bever, C.T. (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.
- Liu, J., Sukhova, G.K., Sun, J.-S., Xu, W.-H., Libby, P., and Shi, G.-P. (2004) Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**: 1359–1366.
- Liuzzo, J.P., Petanceska, S.S., Moscatelli, D., and 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.

Li, W., Li, J., Wu, Y., Wu, J., Hotchandani, R., Cunningham, K., *et al.* (2009) A selective matrix metalloprotease 12 inhibitor for potential treatment of chronic obstructive pulmonary disease (COPD): discovery of (S)-2-(8-(methoxycarbonylamino)dibenzo[b,d]furan-3-sulfonamido)-3-methylbutanoic acid (MMP408). *J Med Chem* **52**: 1799–1802.

Li, Z., Hou, W.S., and 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., and Brömme, D. (2002) Collagenase activity of cathepsin K depends on complex formation with chondroitin sulfate. *J Biol Chem* **277**: 28669–28676.

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.

Li, Z., Yasuda, Y., Li, W., Bogyo, M., Katz, N., Gordon, R.E., *et al.* (2004) Regulation of collagenase activities of human cathepsins by glycosaminoglycans. *J Biol Chem* **279**: 5470–5479.

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

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

Lutgens, E., Lutgens, S.P.M., Faber, B.C.G., Heeneman, S., Gijbels, M.M.J., Winther, M.P.J. de, *et al.* (2006) Disruption of the cathepsin K gene reduces atherosclerosis progression and induces plaque fibrosis but accelerates macrophage foam cell formation. *Circulation* **113**: 98–107.

Lutgens, S.P.M., Cleutjens, K.B.J.M., Daemen, M.J.A.P., and Heeneman, S. (2007) Cathepsin cysteine proteases in cardiovascular disease. *FASEB J* **21**: 3029–3041.

Lu, X., Zhu, T., Chen, C., and Liu, Y. (2014) Right or Left: The Role of Nanoparticles in Pulmonary Diseases. *Int J Mol Sci* **15**: 17577–17600.

Lysenko, E.S., Gould, J., Bals, R., Wilson, J.M., and Weiser, J.N. (2000) Bacterial phosphorylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract. *Infect Immun* **68**: 1664–1671.

M

Mach, L., Mort, J.S., and 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.

MacNee, W. (2000) Oxidants/antioxidants and COPD. *Chest* **117**: 303S–17S.

Macnee, W., and Rahman, I. (1999) Oxidants and antioxidants as therapeutic targets in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **160**: S58–65.

- Ma, G., Greenwell-Wild, T., Lei, K., Jin, W., Swisher, J., Hardegen, N., *et al.* (2004) Secretory leukocyte protease inhibitor binds to annexin II, a cofactor for macrophage HIV-1 infection. *J Exp Med* **200**: 1337–1346.
- Magister, S., and Kos, J. (2013) Cystatins in immune system. *J Cancer* **4**: 45–56.
- Mahler, D.A., Wire, P., Horstman, D., Chang, C.-N., Yates, J., Fischer, T., and Shah, T. (2002) Effectiveness of fluticasone propionate and salmeterol combination delivered via the Diskus device in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **166**: 1084–1091.
- Mak, P., Wójcik, K., Wicherek, L., Suder, P., and Dubin, A. (2004) Antibacterial hemoglobin peptides in human menstrual blood. *Peptides* **25**: 1839–1847.
- Mallia, P., Footitt, J., Sotero, R., Jepson, A., Contoli, M., Trujillo-Torralbo, M.-B., *et al.* (2012) Rhinovirus infection induces degradation of antimicrobial peptides and secondary bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* **186**: 1117–1124.
- Malloy, J.L., Veldhuizen, R.A.W., Thibodeaux, B.A., O’Callaghan, R.J., and Wright, J.R. (2005) *Pseudomonas aeruginosa* protease IV degrades surfactant proteins and inhibits surfactant host defense and biophysical functions. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **288**: L409–418.
- Marchetti, M., Superti, F., Ammendolia, M.G., Rossi, P., Valenti, P., and Seganti, L. (1999) Inhibition of poliovirus type 1 infection by iron-, manganese- and zinc-saturated lactoferrin. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **187**: 199–204.
- Marcos, V., Zhou, Z., Yildirim, A.O., Bohla, A., Hector, A., Vitkov, L., *et al.* (2010) CXCR2 mediates NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation in cystic fibrosis airway inflammation. *Nat Med* **16**: 1018–1023.
- 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.
- Martin, S.L., Moffitt, K.L., McDowell, A., Greenan, C., Bright-Thomas, R.J., Jones, A.M., *et al.* (2010) Association of airway cathepsin B and S with inflammation in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **45**: 860–868.
- Mason, D.Y., and Taylor, C.R. (1975) The distribution of muramidase (lysozyme) in human tissues. *J Clin Pathol* **28**: 124–132.
- Mason, R.W., and Massey, S.D. (1992) Surface activation of pro-cathepsin L. *Biochem Biophys Res Commun* **189**: 1659–1666.
- Matsuzaki, K. (1999) Why and how are peptide–lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochim Biophys Acta* **1462**: 1–10.
- Matsuzaki, K., Murase, O., Fujii, N., and Miyajima, K. (1996) An antimicrobial peptide, magainin 2, induced rapid flip-flop of phospholipids coupled with pore formation and peptide translocation. *Biochemistry* **35**: 11361–11368.

- McCormack, F.X., Gibbons, R., Ward, S.R., Kuzmenko, A., Wu, H., and Deepe, G.S. (2003) Macrophage-independent fungicidal action of the pulmonary collectins. *J Biol Chem* **278**: 36250–36256.
- McCrudden, M.T.C., Orr, D.F., Yu, Y., Coulter, W.A., Manning, G., Irwin, C.R., and Lundy, F.T. (2013) LL-37 in periodontal health and disease and its susceptibility to degradation by proteinases present in gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* **40**: 933–941.
- McGrath, M.E. (1999) The lysosomal cysteine proteases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **28**: 181–204.
- McMichael, J.W., Roghanian, A., Jiang, L., Ramage, R., and Sallenave, J.-M. (2005) The antimicrobial antiproteinase elafin binds to lipopolysaccharide and modulates macrophage responses. *Am J Respir Cell Mol Biol* **32**: 443–452.
- McNeely, T.B., Shugars, D.C., Rosendahl, M., Tucker, C., Eisenberg, S.P., and Wahl, S.M. (1997) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by secretory leukocyte protease inhibitor occurs prior to viral reverse transcription. *Blood* **90**: 1141–1149.
- McQueney, M.S., Amegadzie, B.Y., Alessio, K. D', Hanning, C.R., McLaughlin, M.M., McNulty, D., *et al.* (1997) Autocatalytic activation of human cathepsin K. *J Biol Chem* **272**: 13955–13960.
- Mohamed, M.M., and Sloane, B.F. (2006) Cysteine cathepsins: multifunctional enzymes in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**: 764–775.
- Monsó, E., Ruiz, J., Rosell, A., Manterola, J., Fiz, J., Morera, J., and Ausina, V. (1995) Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush. *Am J Respir Crit Care Med* **152**: 1316–1320.
- Moreau, T., Baranger, K., Dadé, S., Dallet-Choisy, S., Guyot, N., and Zani, M.-L. (2008) Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family. *Biochimie* **90**: 284–295.
- Morrison, D., Rahman, I., Lannan, S., and MacNee, W. (1999) Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers. *Am J Respir Crit Care Med* **159**: 473–479.
- Müller-Esterl, W. (1987) Novel functions of the kininogens. *Semin Thromb Hemost* **13**: 115–126.
- Murakami, M., Lopez-Garcia, B., Braff, M., Dorschner, R.A., and Gallo, R.L. (2004) Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense. *J Immunol* **172**: 3070–3077.
- Murphy, G., Ward, R., Gavrilovic, J., and Atkinson, S. (1992) Physiological mechanisms for metalloproteinase activation. *Matrix Stuttg Ger Suppl* **1**: 224–230.
- Murphy, T.F. (2006) The role of bacteria in airway inflammation in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Infect Dis* **19**: 225–230.

Musil, D., Zucic, D., Turk, D., Engh, R.A., Mayr, I., Huber, R., *et al.* (1991) The refined 2.15 Å X-ray crystal structure of human liver cathepsin B: the structural basis for its specificity. *EMBO J* **10**: 2321–2330.

N

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

Nagaraj, N.S., Vigneswaran, N., and Zacharias, W. (2006) Cathepsin B mediates TRAIL-induced apoptosis in oral cancer cells. *J Cancer Res Clin Oncol* **132**: 171–183.

Nägler, D.K., Storer, A.C., Portaro, F.C., Carmona, E., Juliano, L., and 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., and Ménard, R. (1999) Human cathepsin X: A cysteine protease with unique carboxypeptidase activity. *Biochemistry* **38**: 12648–12654.

Naito, A., Nagao, T., Norisada, K., Mizuno, T., Tuzi, S., and Saitô, H. (2000) Conformation and dynamics of melittin bound to magnetically oriented lipid bilayers by solid-state (31)P and (13)C NMR spectroscopy. *Biophys J* **78**: 2405–2417.

Nakagawa, T., Roth, W., Wong, P., Nelson, A., Farr, A., Deussing, J., *et al.* (1998) Cathepsin L: critical role in li 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., *et al.* (1999) Impaired invariant chain degradation and antigen presentation and diminished collagen-induced arthritis in cathepsin S null mice. *Immunity* **10**: 207–217.

Nakayama, K., Jia, Y.X., Hirai, H., Shinkawa, M., Yamaya, M., Sekizawa, K., and Sasaki, H. (2002) Acid stimulation reduces bactericidal activity of surface liquid in cultured human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**: 105–113.

Nakayama, T., Church, D.F., and Pryor, W.A. (1989) Quantitative analysis of the hydrogen peroxide formed in aqueous cigarette tar extracts. *Free Radic Biol Med* **7**: 9–15.

Nan, Y.H., Bang, J.-K., Jacob, B., Park, I.-S., and Shin, S.Y. (2012) Prokaryotic selectivity and LPS-neutralizing activity of short antimicrobial peptides designed from the human antimicrobial peptide LL-37. *Peptides* **35**: 239–247.

Nara, K., Ito, S., Ito, T., Suzuki, Y., Ghoneim, M.A., Tachibana, S., and Hirose, S. (1994) Elastase inhibitor elafin is a new type of proteinase inhibitor which has a transglutaminase-mediated anchoring sequence termed “cementoin.” *J Biochem* **115**: 441–448.

Naudin, C., Joulin-Giet, A., Couetdic, G., Plésiat, P., Szymanska, A., Gorna, E., *et al.* (2011) Human Cysteine Cathepsins Are Not Reliable Markers of Infection by *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis. *PLoS ONE* **6**: e25577.

- 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.
- Neumann, A., Berends, E.T.M., Nerlich, A., Molhoek, E.M., Gallo, R.L., Meerloo, T., *et al.* (2014a) The antimicrobial peptide LL-37 facilitates the formation of neutrophil extracellular traps. *Biochem J* **464**: 3–11.
- Neumann, A., Völlger, L., Berends, E.T.M., Molhoek, E.M., Stapels, D.A.C., Midon, M., *et al.* (2014b) Novel role of the antimicrobial peptide LL-37 in the protection of neutrophil extracellular traps against degradation by bacterial nucleases. *J Innate Immun* **6**: 860–868.
- Newport, S., Amin, N., and Dozor, A.J. (2009) Exhaled breath condensate pH and ammonia in cystic fibrosis and response to treatment of acute pulmonary exacerbations. *Pediatr Pulmonol* **44**: 866–872.
- Nguyen, Q., Liu, J., Roughley, P.J., and 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.
- Nguyen, Q., Mort, J.S., and Roughley, P.J. (1990) Cartilage proteoglycan aggregate is degraded more extensively by cathepsin L than by cathepsin B. *Biochem J* **266**: 569–573.
- Nightingale, J.A., Rogers, D.F., and Barnes, P.J. (1999) Effect of inhaled ozone on exhaled nitric oxide, pulmonary function, and induced sputum in normal and asthmatic subjects. *Thorax* **54**: 1061–1069.
- Nishimura, Y., Kawabata, T., and 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., and Wiederanders, B. (1999) The half-life of human procathepsin S. *Eur J Biochem FEBS* **263**: 717–725.
- Niyonsaba, F., Iwabuchi, K., Matsuda, H., Ogawa, H., and Nagaoka, I. (2002) Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *Int Immunol* **14**: 421–426.
- Nizet, V. (2006) Antimicrobial peptide resistance mechanisms of human bacterial pathogens. *Curr Issues Mol Biol* **8**: 11–26.
- Nizet, V., Ohtake, T., Lauth, X., Trowbridge, J., Rudisill, J., Dorschner, R.A., *et al.* (2001) Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* **414**: 454–457.
- Nordahl, E.A., Rydengård, V., Mörgelin, M., and Schmidtchen, A. (2005) Domain 5 of high molecular weight kininogen is antibacterial. *J Biol Chem* **280**: 34832–34839.
- Novinec, M., Grass, R.N., Stark, W.J., Turk, V., Baici, A., and Lenarcic, B. (2007) Interaction between human cathepsins K, L, and S and elastins: mechanism of elastinolysis and inhibition by macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* **282**: 7893–7902.

Novinec, M., and Lenarčič, B. (2013) Papain-like peptidases: structure, function, and evolution. *Biomol Concepts* **4**: 287–308.

O

Oberle, C., Huai, J., Reinheckel, T., Tacke, M., Rassner, M., Ekert, P.G., *et al.* (2010) Lysosomal membrane permeabilization and cathepsin release is a Bax/Bak-dependent, amplifying event of apoptosis in fibroblasts and monocytes. *Cell Death Differ* **17**: 1167–1178.

Obermajer, N., Repnik, U., Jevnikar, Z., Turk, B., Kreft, M., and Kos, J. (2008) Cysteine protease cathepsin X modulates immune response via activation of beta2 integrins. *Immunology* **124**: 76–88.

Ohlmeier, S., Vuolanto, M., Toljamo, T., Vuopala, K., Salmenkivi, K., Myllärniemi, M., and Kinnula, V.L. (2008) Proteomics of human lung tissue identifies surfactant protein A as a marker of chronic obstructive pulmonary disease. *J Proteome Res* **7**: 5125–5132.

Ohno, N., and Morrison, D.C. (1989) Lipopolysaccharide interaction with lysozyme. Binding of lipopolysaccharide to lysozyme and inhibition of lysozyme enzymatic activity. *J Biol Chem* **264**: 4434–4441.

Ohta, H., Chiba, S., Ebina, M., Furuse, M., and Nukiwa, T. (2012) Altered expression of tight junction molecules in alveolar septa in lung injury and fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **302**: L193–205.

Okamura-Oho, Y., Zhang, S., Callahan, J.W., Murata, M., Oshima, A., and 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.

Ong, P.Y., Ohtake, T., Brandt, C., Strickland, I., Boguniewicz, M., Ganz, T., *et al.* (2002) Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med* **347**: 1151–1160.

Oörni, K., Sneek, M., Brömme, D., Pentikäinen, M.O., Lindstedt, K.A., Mäyränpää, M., *et al.* (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.

Oppenheim, F.G., Xu, T., McMillian, F.M., Levitz, S.M., Diamond, R.D., Offner, G.D., and Troxler, R.F. (1988) Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J Biol Chem* **263**: 7472–7477.

Otvos, L., O, I., Rogers, M.E., Consolvo, P.J., Condie, B.A., Lovas, S., *et al.* (2000) Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry* **39**: 14150–14159.

Overhage, J., Campisano, A., Bains, M., Torfs, E.C.W., Rehm, B.H.A., and Hancock, R.E.W. (2008) Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infect Immun* **76**: 4176–4182.

Owen, C.A. (2005) Proteinases and oxidants as targets in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* **2**: 373–385; discussion 394–395.

Owen, C.A., Campbell, M.A., Boukedes, S.S., and Campbell, E.J. (1997) Cytokines regulate membrane-bound leukocyte elastase on neutrophils: a novel mechanism for effector activity. *Am J Physiol* **272**: L385–393.

P

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

Palmer, J.T., Rasnick, D., Klaus, J.L., and 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., and Ogawa, H. (2002) Immunohistochemical localization of cathepsin L and cystatin A in normal skin and skin tumors. *J Dermatol* **29**: 573–579.

Paone, G., Conti, V., Leone, A., Schmid, G., Puglisi, G., Giannunzio, G., and Terzano, C. (2011) Human neutrophil peptides sputum levels in symptomatic smokers and COPD patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **15**: 556–562.

Papi, A., Bellettato, C.M., Braccioni, F., Romagnoli, M., Casolari, P., Caramori, G., *et al.* (2006) Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* **173**: 1114–1121.

Parameswaran, G.I., Sethi, S., and Murphy, T.F. (2011) Effects of bacterial infection on airway antimicrobial peptides and proteins in COPD. *Chest* **140**: 611–617.

Park, C.B., Kim, H.S., and Kim, S.C. (1998) Mechanism of Action of the Antimicrobial Peptide Buforin II: Buforin II Kills Microorganisms by Penetrating the Cell Membrane and Inhibiting Cellular Functions. *Biochem Biophys Res Commun* **244**: 253–257.

Parks, W.C., Wilson, C.L., and López-Boado, Y.S. (2004) Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* **4**: 617–629.

Patrzykat, A., Friedrich, C.L., Zhang, L., Mendoza, V., and Hancock, R.E.W. (2002) Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 605–614.

Payne, C.D., Deeg, M.A., Chan, M., Tan, L.H., LaBell, E.S., Shen, T., and DeBrot, D.J. (2014) Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cathepsin S Inhibitor, LY3000328, in Healthy Subjects. *Br J Clin Pharmacol* .

Pazgier, M., Ericksen, B., Ling, M., Toth, E., Shi, J., Li, X., *et al.* (2013) Structural and functional analysis of the pro-domain of human cathelicidin, LL-37. *Biochemistry* **52**: 1547–1558.

- Pechkovsky, D.V., Zissel, G., Stamme, C., Goldmann, T., Ari Jaffe, H., Einhaus, M., *et al.* (2002) Human alveolar epithelial cells induce nitric oxide synthase-2 expression in alveolar macrophages. *Eur Respir J* **19**: 672–683.
- Percival, M.D., Ouellet, M., Campagnolo, C., Claveau, D., and 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., and Lalmanach, G. (2006) Cysteine cathepsins in human silicotic bronchoalveolar lavage fluids. *Biochim Biophys Acta* **1762**: 351–356.
- Perera, N.C., Schilling, O., Kittel, H., Back, W., Kremmer, E., and Jenne, D.E. (2012) NSP4, an elastase-related protease in human neutrophils with arginine specificity. *Proc Natl Acad Sci* **109**: 6229–6234.
- Peric, M., Koglin, S., Kim, S.-M., Morizane, S., Besch, R., Prinz, J.C., *et al.* (2008) IL-17A enhances vitamin D3-induced expression of cathelicidin antimicrobial peptide in human keratinocytes. *J Immunol* **181**: 8504–8512.
- Persson, A., Chang, D., and Crouch, E. (1990) Surfactant protein D is a divalent cation-dependent carbohydrate-binding protein. *J Biol Chem* **265**: 5755–5760.
- Petanceska, S., Canoll, P., and Devi, L.A. (1996) Expression of rat cathepsin S in phagocytic cells. *J Biol Chem* **271**: 4403–4409.
- Pettit, R.S., and Fellner, C. (2014) CFTR Modulators for the Treatment of Cystic Fibrosis. *P T Peer-Rev J Formul Manag* **39**: 500–511.
- Pham, C.T., and 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* **96**: 8627–8632.
- Podobnik, M., Kuhelj, R., Turk, V., and Turk, D. (1997) Crystal structure of the wild-type human procathepsin B at 2.5 Å resolution reveals the native active site of a papain-like cysteine protease zymogen. *J Mol Biol* **271**: 774–788.
- Pourtois, M., Binet, C., Tieghem, N. Van, Courtois, P.R., Vandenabeele, A., and Thirty, L. (1991) Saliva can contribute in quick inhibition of HIV infectivity. *AIDS Lond Engl* **5**: 598–600.
- Powers, J.-P.S., and Hancock, R.E.. (2003) The relationship between peptide structure and antibacterial activity. *Antimicrob Pept II* **24**: 1681–1691.
- Pozgan, U., Caglic, D., Rozman, B., Nagase, H., Turk, V., and Turk, B. (2010) Expression and activity profiling of selected cysteine cathepsins and matrix metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Biol Chem* **391**: 571–579.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., and Klein, D.A. (2003) *Microbiologie*. de Boeck edn.,.
- Proctor, V.A., and Cunningham, F.E. (1988) The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *Crit Rev Food Sci Nutr* **26**: 359–395.

Pryor, W.A., and Stone, K. (1993) Oxidants in cigarette smoke. Radicals, hydrogen peroxide, peroxynitrate, and peroxynitrite. *Ann N Y Acad Sci* **686**: 12–27; discussion 27–28.

Punturieri, A., Filippov, S., Allen, E., Caras, I., Murray, R., Reddy, V., and Weiss, S.J. (2000) Regulation of Elastolytic Cysteine Proteinase Activity in Normal and Cathepsin K-Deficient Human Macrophages. *J Exp Med* **192**: 789–800.

Q

Quiñones-Mateu, M.E., Lederman, M.M., Feng, Z., Chakraborty, B., Weber, J., Rangel, H.R., *et al.* (2003) Human epithelial beta-defensins 2 and 3 inhibit HIV-1 replication. *AIDS Lond Engl* **17**: F39–48.

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

R

Rahman, I., Morrison, D., Donaldson, K., and MacNee, W. (1996) Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers. *Am J Respir Crit Care Med* **154**: 1055–1060.

Ramsey, B.W., Dorkin, H.L., Eisenberg, J.D., Gibson, R.L., Harwood, I.R., Kravitz, R.M., *et al.* (1993) Efficacy of aerosolized tobramycin in patients with cystic fibrosis. *N Engl J Med* **328**: 1740–1746.

Ranganathan, S., Simpson, K.J., Shaw, D.C., and Nicholas, K.R. (1999) The whey acidic protein family: a new signature motif and three-dimensional structure by comparative modeling. *J Mol Graph Model* **17**: 106–113, 134–136.

Ratner, A.J., and Prince, A. (2000) Lactoperoxidase. New recognition of an “old” enzyme in airway defenses. *Am J Respir Cell Mol Biol* **22**: 642–644.

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

Rawlings, N.D., and Barrett, A.J. (1994) Families of cysteine peptidases. *Methods Enzymol* **244**: 461–486.

Rawlings, N.D., Tolle, D.P., and Barrett, A.J. (2004) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* **32**: D160–164.

Rawlings, N.D., Waller, M., Barrett, A.J., and Bateman, A. (2014) MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res* **42**: D503–509.

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* **92**: 3849–3853.

Reeves, E.P., Bergin, D.A., Murray, M.A., and McElvaney, N.G. (2011) The involvement of glycosaminoglycans in airway disease associated with cystic fibrosis. *Scientific World Journal* **11**: 959–971.

- Reilly, J.J., Chen, P., Sailor, L.Z., Wilcox, D., Mason, R.W., and Chapman, H.A. (1991) Cigarette smoking induces an elastolytic cysteine proteinase in macrophages distinct from cathepsin L. *Am J Physiol* **261**: L41–48.
- Reiser, J., Adair, B., and Reinheckel, T. (2010) Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *J Clin Invest* **120**: 3421–3431.
- Repnik, U., and Turk, B. (2010) Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death. *Mitochondrion* **10**: 662–669.
- Retsch-Bogart, G.Z., Quittner, A.L., Gibson, R.L., Oermann, C.M., McCoy, K.S., Montgomery, A.B., and Cooper, P.J. (2009) Efficacy and safety of inhaled aztreonam lysine for airway pseudomonas in cystic fibrosis. *Chest* **135**: 1223–1232.
- Rich, D.H., Brown, M.A., and Barrett, A.J. (1986) Purification of cathepsin B by a new form of affinity chromatography. *Biochem J* **235**: 731–734.
- Riese, R.J., and Chapman, H.A. (2000) Cathepsins and compartmentalization in antigen presentation. *Curr Opin Immunol* **12**: 107–113.
- Riese, R.J., Mitchell, R.N., Villadangos, J.A., Shi, G.P., Palmer, J.T., Karp, E.R., *et al.* (1998) Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity. *J Clin Invest* **101**: 2351–2363.
- Riese, R.J., Wolf, P.R., Brömme, D., Natkin, L.R., Villadangos, J.A., Ploegh, H.L., and Chapman, H.A. (1996) Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading. *Immunity* **4**: 357–366.
- Riordan, J.R. (2008) CFTR function and prospects for therapy. *Annu Rev Biochem* **77**: 701–726.
- Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., *et al.* (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**: 1066–1073.
- Rodríguez, D., Morrison, C.J., and Overall, C.M. (2010) Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *Biochim Biophys Acta* **1803**: 39–54.
- Rogan, M., Geraghty, P., Greene, C., O'Neill, S., Taggart, C., and McElvaney, N. (2006) Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence. *Respir Res* **7**: 29.
- Rogan, M.P., Stoltz, D.A., and Hornick, D.B. (2011) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator intracellular processing, trafficking, and opportunities for mutation-specific treatment. *Chest* **139**: 1480–1490.
- 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.
- Rowan, A.D., Mason, P., Mach, L., and Mort, J.S. (1992) Rat procathepsin B. Proteolytic processing to the mature form in vitro. *J Biol Chem* **267**: 15993–15999.

Rozek, A., Friedrich, C.L., and Hancock, R.E. (2000) Structure of the bovine antimicrobial peptide indolicidin bound to dodecylphosphocholine and sodium dodecyl sulfate micelles. *Biochemistry* **39**: 15765–15774.

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

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.

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

Russell, R.E.K., Culpitt, S.V., DeMatos, C., Donnelly, L., Smith, M., Wiggins, J., and Barnes, P.J. (2002) Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* **26**: 602–609.

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

S

Saftig, P., Hunziker, E., Wehmeyer, O., Jones, S., Boyde, A., Rommerskirch, W., *et al.* (1998) Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 13453–13458.

Sage, J., Leblanc-Noblesse, E., Nizard, C., Sasaki, T., Schnebert, S., Perrier, E., *et al.* (2012) Cleavage of nidogen-1 by cathepsin S impairs its binding to basement membrane partners. *PLoS One* **7**: e43494.

Sagel, S.D., Kapsner, R.K., and Osberg, I. (2005) Induced sputum matrix metalloproteinase-9 correlates with lung function and airway inflammation in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **39**: 224–232.

Sagel, S.D., Sontag, M.K., and Accurso, F.J. (2009) Relationship between antimicrobial proteins and airway inflammation and infection in cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* **44**: 402–409.

Sallenave, J.M., Marsden, M.D., and Ryle, A.P. (1992) Isolation of elafin and elastase-specific inhibitor (ESI) from bronchial secretions. Evidence of sequence homology and immunological cross-reactivity. *Biol Chem Hoppe Seyler* **373**: 27–33.

Sallenave, J.-M., and Shapiro, S. (2008) Proteases and antiproteases in development, homeostasis and disease: The old, the new, and the unknown.. *Int J Biochem Cell Biol* **40**: 1066–1067.

Sallenave, J.M., Shulmann, J., Crossley, J., Jordana, M., and Gauldie, J. (1994) Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes. *Am J Respir Cell Mol Biol* **11**: 733–741.

- Sallenave, J.M., Si Tahar, M., Cox, G., Chignard, M., and Gauldie, J. (1997) Secretory leukocyte proteinase inhibitor is a major leukocyte elastase inhibitor in human neutrophils. *J Leukoc Biol* **61**: 695–702.
- Salvesen, G., Parkes, C., Abrahamson, M., Grubb, A., and 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.
- Salzman, R.A., Koiwa, H., Ibeas, J.I., Pardo, J.M., Hasegawa, P.M., and Bressan, R.A. (2004) Inorganic cations mediate plant PR5 protein antifungal activity through fungal Mnn1- and Mnn4-regulated cell surface glycans. *Mol Plant-Microbe Interact MPMI* **17**: 780–788.
- Samokhin, A.O., Lythgo, P.A., Gauthier, J.Y., Percival, M.D., and Brömme, D. (2010) Pharmacological inhibition of cathepsin S decreases atherosclerotic lesions in Apoe^{-/-} mice. *J Cardiovasc Pharmacol* **56**: 98–105.
- Sano, C., Shimizu, T., Sato, K., Kawauchi, H., and Tomioka, H. (2000) Effects of secretory leukocyte protease inhibitor on the production of the anti-inflammatory cytokines, IL-10 and transforming growth factor-beta (TGF-beta), by lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Clin Exp Immunol* **121**: 77–85.
- Sansom, M.S. (1991) The biophysics of peptide models of ion channels. *Prog Biophys Mol Biol* **55**: 139–235.
- Schamberger, A.C., Mise, N., Jia, J., Genoyer, E., Yildirim, A.Ö., Meiners, S., and Eickelberg, O. (2014) Cigarette smoke-induced disruption of bronchial epithelial tight junctions is prevented by transforming growth factor- β . *Am J Respir Cell Mol Biol* **50**: 1040–1052.
- Schamberger, A.C., Staab-Weijnitz, C.A., Mise-Racek, N., and Eickelberg, O. (2015) Cigarette smoke alters primary human bronchial epithelial cell differentiation at the air-liquid interface. *Sci Rep* **5**: 8163.
- Schaschke, N., Assfalg-Machleidt, I., Machleidt, W., and Moroder, L. (1998) Substrate/propeptide-derived endo-epoxysuccinyl peptides as highly potent and selective cathepsin B inhibitors. *FEBS Lett* **421**: 80–82.
- Schechter, I., and 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., *et al.* (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.
- Schmidtchen, A., Frick, I.-M., Andersson, E., Tapper, H., and Björck, L. (2002) Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Mol Microbiol* **46**: 157–168.
- Schneider, J.J., Unholzer, A., Schaller, M., Schäfer-Korting, M., and Korting, H.C. (2005) Human defensins. *J Mol Med Berl Ger* **83**: 587–595.

- Schultz, H., and Weiss, J.P. (2007) The bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) in infection and inflammatory disease. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* **384**: 12–23.
- Schwarz, G., Boehncke, W.-H., Braun, M., Schröter, C.J., Burster, T., Flad, T., *et al.* (2002) Cathepsin S activity is detectable in human keratinocytes and is selectively upregulated upon stimulation with interferon-gamma. *J Invest Dermatol* **119**: 44–49.
- Scott, A., Weldon, S., and Taggart, C.C. (2011) SLPI and elafin: multifunctional antiproteases of the WFDC family. *Biochem Soc Trans* **39**: 1437–1440.
- Scott, M.G., Davidson, D.J., Gold, M.R., Bowdish, D., and Hancock, R.E.W. (2002) The Human Antimicrobial Peptide LL-37 Is a Multifunctional Modulator of Innate Immune Responses. *J Immunol* **169**: 3883–3891.
- Seemüller, U., Arnhold, M., Fritz, H., Wiedenmann, K., Machleidt, W., Heinzl, R., *et al.* (1986) The acid-stable proteinase inhibitor of human mucous secretions (HUSI-I, antileukoprotease). Complete amino acid sequence as revealed by protein and cDNA sequencing and structural homology to whey proteins and Red Sea turtle proteinase inhibitor. *FEBS Lett* **199**: 43–48.
- Selsted, M.E., Harwig, S.S., Ganz, T., Schilling, J.W., and Lehrer, R.I. (1985) Primary structures of three human neutrophil defensins. *J Clin Invest* **76**: 1436–1439.
- Selsted, M.E., Novotny, M.J., Morris, W.L., Tang, Y.Q., Smith, W., and Cullor, J.S. (1992) Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J Biol Chem* **267**: 4292–4295.
- Selsted, M.E., and Ouellette, A.J. (2005) Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol* **6**: 551–557.
- Seppänen, O., Glumoff, V., Paananen, R., Rounioja, S., and Hallman, M. (2005) Transcription factors NF-kappaB and C/EBPdelta and IL-1-induced expression of surfactant protein A in lung explants during the perinatal period. *Biol Neonate* **87**: 152–159.
- Serveau-Avesque, C., Martino, M.F.-D., Hervé-Grépinet, V., Hazouard, E., Gauthier, F., Diot, E., and Lalmanach, G. (2006) Active cathepsins B, H, K, L and S in human inflammatory bronchoalveolar lavage fluids. *Biol Cell Auspices Eur Cell Biol Organ* **98**: 15–22.
- Sethi, S., and Murphy, T.F. (2008) Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* **359**: 2355–2365.
- Shai, Y. (1999) Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta* **1462**: 55–70.
- Shapiro, S.D., Campbell, E.J., Kobayashi, D.K., and Welgus, H.G. (1991) Dexamethasone selectively modulates basal and lipopolysaccharide-induced metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase production by human alveolar macrophages. *J Immunol* **146**: 2724–2729.
- Shaw, E. (1990) Cysteiny proteinases and their selective inactivation. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **63**: 271–347.

Shaykhiev, R., Otaki, F., Bonsu, P., Dang, D.T., Teater, M., Strulovici-Barel, Y., *et al.* (2011) Cigarette smoking reprograms apical junctional complex molecular architecture in the human airway epithelium in vivo. *Cell Mol Life Sci* **68**: 877–892.

Shi, G.P., Munger, J.S., Meara, J.P., Rich, D.H., and 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., Sukhova, G.K., Grubb, A., Ducharme, A., Rhode, L.H., Lee, R.T., *et al.* (1999) Cystatin C deficiency in human atherosclerosis and aortic aneurysms. *J Clin Invest* **104**: 1191–1197.

Shi, G.-P., Sukhova, G.K., Kuzuya, M., Ye, Q., Du, J., Zhang, Y., *et al.* (2003) Deficiency of the cysteine protease cathepsin S impairs microvessel growth. *Circ Res* **92**: 493–500.

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.

Shin, K., Wakabayashi, H., Yamauchi, K., Teraguchi, S., Tamura, Y., Kurokawa, M., and Shiraki, K. (2005) Effects of orally administered bovine lactoferrin and lactoperoxidase on influenza virus infection in mice. *J Med Microbiol* **54**: 717–723.

Sieprawska-Lupa, M., Mydel, P., Krawczyk, K., Wójcik, K., Puklo, M., Lupa, B., *et al.* (2004) Degradation of Human Antimicrobial Peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-Derived Proteinases. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 4673–4679.

Simpson, A.J., Maxwell, A.I., Govan, J.R., Haslett, C., and Sallenave, J.M. (1999) Elafin (elastase-specific inhibitor) has anti-microbial activity against gram-positive and gram-negative respiratory pathogens. *FEBS Lett* **452**: 309–313.

Singh, P.K., Jia, H.P., Wiles, K., Hesselberth, J., Liu, L., Conway, B.A., *et al.* (1998) Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 14961–14966.

Sivaraman, J., Nägler, D.K., Zhang, R., Ménard, R., and Cygler, M. (2000) Crystal structure of human procathepsin X: a cysteine protease with the proregion covalently linked to the active site cysteine. *J Mol Biol* **295**: 939–951.

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.

Smet, K. De, and Contreras, R. (2005) Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett* **27**: 1337–1347.

Smith, J.J., Travis, S.M., Greenberg, E.P., and Welsh, M.J. (1996) Cystic Fibrosis Airway Epithelia Fail to Kill Bacteria Because of Abnormal Airway Surface Fluid. *Cell* **85**: 229–236.

Snider, G.L. (1992) Emphysema: the first two centuries--and beyond. A historical overview, with suggestions for future research: Part 2. *Am Rev Respir Dis* **146**: 1615–1622.

Sochacki, K.A., Barns, K.J., Bucki, R., and Weisshaar, J.C. (2011) Real-time attack on single *Escherichia coli* cells by the human antimicrobial peptide LL-37. *Proc Natl Acad Sci* **108**: E77–E81.

Soehnlein, O., Kai-Larsen, Y., Frithiof, R., Sorensen, O.E., Kenne, E., Scharffetter-Kochanek, K., *et al.* (2008) Neutrophil primary granule proteins HBP and HNP1-3 boost bacterial phagocytosis by human and murine macrophages. *J Clin Invest* **118**: 3491–3502.

Soini, Y. (2011) Claudins in lung diseases. *Respir Res* **12**: 70.

Solleiro-Villavicencio, H., Quintana-Carrillo, R., Falfán-Valencia, R., and Vargas-Rojas, M.I. (2015) Chronic Obstructive Pulmonary Disease induced by exposure to biomass smoke is associated with a Th2 cytokine production profile. *Clin Immunol* DOI: 10.1016/j.clim.2015.07.009

Somoza, J.R., Palmer, J.T., and Ho, J.D. (2002) The crystal structure of human cathepsin F and its implications for the development of novel immunomodulators. *J Mol Biol* **322**: 559–568.

Song, Y., Salinas, D., Nielson, D.W., and Verkman, A.S. (2006) Hyperacidity of secreted fluid from submucosal glands in early cystic fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**: C741–749.

Sørensen, O.E., Follin, P., Johnsen, A.H., Calafat, J., Tjabringa, G.S., Hiemstra, P.S., and Borregaard, N. (2001) Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3. *Blood* **97**: 3951–3959.

Sørensen, O.E., Gram, L., Johnsen, A.H., Andersson, E., Bangsbøll, S., Tjabringa, G.S., *et al.* (2003) Processing of seminal plasma hCAP-18 to ALL-38 by gastricsin: a novel mechanism of generating antimicrobial peptides in vagina. *J Biol Chem* **278**: 28540–28546.

Spiegelman, B.M., and Ginty, C.A. (1983) Fibronectin modulation of cell shape and lipogenic gene expression in 3T3-adipocytes. *Cell* **35**: 657–666.

Starner, T.D., Barker, C.K., Jia, H.P., Kang, Y., and McCray, P.B. (2003) CCL20 is an inducible product of human airway epithelia with innate immune properties. *Am J Respir Cell Mol Biol* **29**: 627–633.

Steen, P.E. Van den, Proost, P., Wuyts, A., Damme, J. Van, and Opdenakker, G. (2000) Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO-alpha and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood* **96**: 2673–2681.

Stern, I., Schaschke, N., Moroder, L., and 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.

Stevens, T., Ekholm, K., Gränse, M., Lindahl, M., Kozma, V., Jungar, C., *et al.* (2011) AZD9668: pharmacological characterization of a novel oral inhibitor of neutrophil elastase. *J Pharmacol Exp Ther* **339**: 313–320.

- Stinchcombe, J.C., and Griffiths, G.M. (1999) Regulated secretion from hemopoietic cells. *J Cell Biol* **147**: 1–6.
- Stoeckle, C., Gouttefangeas, C., Hammer, M., Weber, E., Melms, A., and Tolosa, E. (2009) Cathepsin W expressed exclusively in CD8⁺ T cells and NK cells, is secreted during target cell killing but is not essential for cytotoxicity in human CTLs. *Exp Hematol* **37**: 266–275.
- Storer, A.C., and Ménard, R. (1994) Catalytic mechanism in papain family of cysteine peptidases. *Methods Enzymol* **244**: 486–500.
- Storm van's Gravesande, K., Layne, M.D., Ye, Q., Le, L., Baron, R.M., Perrella, M.A., *et al.* (2002) IFN regulatory factor-1 regulates IFN-gamma-dependent cathepsin S expression. *J Immunol* **168**: 4488–4494.
- Stubbs, M.T., Laber, B., Bode, W., Huber, R., Jerala, R., Lenarcic, B., and 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.
- Sturton, R.G., Trifilieff, A., Nicholson, A.G., and Barnes, P.J. (2008) Pharmacological characterization of indacaterol, a novel once daily inhaled 2 adrenoceptor agonist, on small airways in human and rat precision-cut lung slices. *J Pharmacol Exp Ther* **324**: 270–275.
- Subbalakshmi, C., and Sitaram, N. (1998) Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. *FEMS Microbiol Lett* **160**: 91–96.
- Sukhova, G.K., Shi, G.P., Simon, D.I., Chapman, H.A., and 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.
- Sukhova, G.K., Zhang, Y., Pan, J.-H., Wada, Y., Yamamoto, T., Naito, M., *et al.* (2003) Deficiency of cathepsin S reduces atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* **111**: 897–906.
- Sumiya, S., Yoneda, T., Kitamura, K., Murata, M., Yokoo, C., Tamai, M., *et al.* (1992) Molecular design of potent inhibitor specific for cathepsin B based on the tertiary structure prediction. *Chem Pharm Bull* **40**: 299–303.
- Sutherland, R.E., Barry, S.S., Olsen, J.S., Salantes, D.B., Caughey, G.H., and Wolters, P.J. (2014) Dipeptidyl peptidase I controls survival from *Klebsiella pneumoniae* lung infection by processing surfactant protein D. *Biochem Biophys Res Commun* **450**: 818–823.
- Szafranski, W., Cukier, A., Ramirez, A., Menga, G., Sansores, R., Nahabedian, S., *et al.* (2003) Efficacy and safety of budesonide/formoterol in the management of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* **21**: 74–81.

T

- Taggart, C.C., Greene, C.M., Smith, S.G., Levine, R.L., McCray, P.B., O'Neill, S., and McElvaney, N.G. (2003) Inactivation of Human β -Defensins 2 and 3 by Elastolytic Cathepsins. *J Immunol* **171**: 931–937.
- 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.
- Takeyabu, K., Betsuyaku, T., Nishimura, M., Yoshioka, A., Tanino, M., Miyamoto, K., and Kawakami, Y. (1998) Cysteine proteinases and cystatin C in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema. *Eur Respir J* **12**: 1033–1039.
- Takizawa, H., Tanaka, M., Takami, K., Ohtoshi, T., Ito, K., Satoh, M., *et al.* (2001) Increased expression of transforming growth factor-beta1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Am J Respir Crit Care Med* **163**: 1476–1483.
- Taleb, S., and 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., and Sahagian, G.G. (1994) The proregion of cathepsin L is required for proper folding, stability, and ER exit. *Arch Biochem Biophys* **311**: 19–27.
- Tashkin, D., Kanner, R., Bailey, W., Buist, S., Anderson, P., Nides, M., *et al.* (2001) Smoking cessation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a double-blind, placebo-controlled, randomised trial. *Lancet Lond Engl* **357**: 1571–1575.
- 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.
- Tavilani, H., Nadi, E., Karimi, J., and Goodarzi, M.T. (2012) Oxidative stress in COPD patients, smokers, and non-smokers. *Respir Care* **57**: 2090–2094.
- Tersariol, I.L.S., Pimenta, D.C., Chagas, J.R., and Almeida, P.C. (2002) Proteinase activity regulation by glycosaminoglycans. *Braz J Med Biol Res* **35**: 135–144.
- Thomassin, J.-L., Brannon, J.R., Gibbs, B.F., Gruenheid, S., and Moual, H. Le (2012) OmpT Outer Membrane Proteases of Enterohemorrhagic and Enteropathogenic Escherichia coli Contribute Differently to the Degradation of Human LL-37. *Infect Immun* **80**: 483–492.
- Thompson, R.C., and Ohlsson, K. (1986) Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase. *Proc Natl Acad Sci* **83**: 6692–6696.
- Thompson, S.K., Halbert, S.M., Bossard, M.J., Tomaszek, T.A., Levy, M.A., Zhao, B., *et al.* (1997) Design of potent and selective human cathepsin K inhibitors that span the active site. *Proc Natl Acad Sci* **94**: 14249–14254.

- Tjabringa, G.S., Ninaber, D.K., Drijfhout, J.W., Rabe, K.F., and Hiemstra, P.S. (2006) Human cathelicidin LL-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors. *Int Arch Allergy Immunol* **140**: 103–112.
- Tjabringa, S.G., Rabe, K.F., and Hiemstra, P.S. (2005) The human cathelicidin LL-37: a multifunctional peptide involved in infection and inflammation in the lung. *Pulm Pharmacol Ther* **18**: 321–327.
- Tolosa, E., Li, W., Yasuda, Y., Wienhold, W., Denzin, L.K., Lautwein, A., *et al.* (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.
- Tomee, J.F., Hiemstra, P.S., Heinzl-Wieland, R., and Kauffman, H.F. (1997) Antileukoprotease: an endogenous protein in the innate mucosal defense against fungi. *J Infect Dis* **176**: 740–747.
- Tossi, A., Sandri, L., and Giangaspero, A. (2000) Amphipathic, α -helical antimicrobial peptides. *Pept Sci* **55**: 4–30.
- Trabandt, A., Aicher, W.K., Gay, R.E., Sukhatme, V.P., Nilson-Hamilton, M., Hamilton, R.T., *et al.* (1990) Expression of the collagenolytic and Ras-induced cysteine proteinase cathepsin L and proliferation-associated oncogenes in synovial cells of MRL/I mice and patients with rheumatoid arthritis. *Matrix* **10**: 349–361.
- Trabandt, A., Gay, R.E., Fassbender, H.G., and Gay, S. (1991) Cathepsin B in synovial cells at the site of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **34**: 1444–1451.
- Trezise, A.E., and Buchwald, M. (1991) In vivo cell-specific expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* **353**: 434–437.
- Troen, B.R. (2006) The regulation of cathepsin K gene expression. *Ann N Y Acad Sci* **1068**: 165–172.
- Troen, B.R., Chauhan, S.S., Ray, D., and Gottesman, M.M. (1991) Downstream sequences mediate induction of the mouse cathepsin L promoter by phorbol esters. *Cell Growth Differ* **2**: 23–31.
- Trojanek, J.B., Cobos-Correa, A., Diemer, S., Kormann, M., Schubert, S.C., Zhou-Suckow, Z., *et al.* (2014) Airway mucus obstruction triggers macrophage activation and matrix metalloproteinase 12-dependent emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol* **51**: 709–720.
- Tsai, H., and Bobek, L.A. (1998) Human salivary histatins: promising anti-fungal therapeutic agents. *Crit Rev Oral Biol Med* **9**: 480–497.
- Tsoumakidou, M., Bouloukaki, I., Thimaki, K., Tzanakis, N., and Siafakas, N.M. (2010) Innate immunity proteins in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis. *Exp Lung Res* **36**: 373–380.
- Tsushima, H., Ueki, A., Matsuoka, Y., Mihara, H., and Hopsu-Havu, V.K. (1991) Characterization of a cathepsin-H-like enzyme from a human melanoma cell line. *Int J Cancer J Int Cancer* **48**: 726–732.

Turino, G.M. (2002) The origins of a concept: the protease-antiprotease imbalance hypothesis. *Chest* **122**: 1058–1060.

Turk, B., Bieth, J.G., Björk, I., Dolenc, I., Turk, D., Cimerman, N., *et al.* (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., and Björk, I. (1996) High-molecular-weight kininogen binds two molecules of cysteine proteinases with different rate constants. *FEBS Lett* **391**: 109–112.

Turk, B., and Turk, V. (2009) Lysosomes as “suicide bags” in cell death: myth or reality? *J Biol Chem* **284**: 21783–21787.

Turk, D., and Guncar, G. (2003) Lysosomal cysteine proteases (cathepsins): promising drug targets. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **59**: 203–213.

Turk, D., Guncar, G., Podobnik, M., and Turk, B. (1998) Revised definition of substrate binding sites of papain-like cysteine proteases. *Biol Chem* **379**: 137–147.

Turk, D., Janjić, V., Stern, I., Podobnik, M., Lamba, D., Dahl, S.W., *et al.* (2001) 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., and Turk, V. (2003) Papain-like lysosomal cysteine proteases and their inhibitors: drug discovery targets? *Biochem Soc Symp* 15–30.

Turk, V., and Bode, W. (1991) The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* **285**: 213–219.

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. *Proteolysis 50 Years Discov Lysosome* **1824**: 68–88.

Turnsek, T., Kregar, I., and Lebez, D. (1975) Acid sulphydryl protease from calf lymph nodes. *Biochim Biophys Acta* **403**: 514–520.

V

Vandamme, D., Landuyt, B., Luyten, W., and Schoofs, L. (2012) A comprehensive summary of LL-37, the factotum human cathelicidin peptide. *Cell Immunol* **280**: 22–35.

Vasconcellos, C.A., Allen, P.G., Wohl, M.E., Drazen, J.M., Janmey, P.A., and Stossel, T.P. (1994) Reduction in viscosity of cystic fibrosis sputum in vitro by gelsolin. *Science* **263**: 969–971.

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.

Vasiljeva, O., Korovin, M., Gajda, M., Brodoefel, H., Bojic, L., Krüger, A., *et al.* (2008) Reduced tumour cell proliferation and delayed development of high-grade mammary carcinomas in cathepsin B-deficient mice. *Oncogene* **27**: 4191–4199.

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

Virella-Lowell, I., Poirier, A., Chesnut, K.A., Brantly, M., and Flotte, T.R. (2000) Inhibition of recombinant adeno-associated virus (rAAV) transduction by bronchial secretions from cystic fibrosis patients. *Gene Ther* **7**: 1783–1789.

Vogelmeier, C., Hubbard, R.C., Fells, G.A., Schnebli, H.P., Thompson, R.C., Fritz, H., and Crystal, R.G. (1991) Anti-neutrophil elastase defense of the normal human respiratory epithelial surface provided by the secretory leukoprotease inhibitor. *J Clin Invest* **87**: 482–488.

Voss, M., Wonnenberg, B., Honecker, A., Kamyschnikow, A., Herr, C., Bischoff, M., *et al.* (2015) Cigarette smoke-promoted acquisition of bacterial pathogens in the upper respiratory tract leads to enhanced inflammation in mice. *Respir Res* **16** DOI: 10.1186/s12931-015-0204-8

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

W

Wada, H., and Takizawa, H. (2013) Future treatment for COPD: targeting oxidative stress and its related signal. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* **7**: 1–11.

Wahl, S.M., McNeely, T.B., Janoff, E.N., Shugars, D., Worley, P., Tucker, C., and Orenstein, J.M. (1997) Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in mucosal fluids inhibits HIV-I. *Oral Dis* **3 Suppl 1**: S64–69.

Wallaert, B., Aerts, C., Gressier, B., Gosset, P., and Voisin, C. (1993) Oxidative inactivation of alpha 1-proteinase inhibitor by alveolar epithelial type II cells. *J Appl Physiol Bethesda Md* **1985** **75**: 2376–2382.

Wallin, H., Bjarnadottir, M., Vogel, L.K., Wassélius, J., Ekström, U., and Abrahamson, M. (2010) Cystatins--Extra- and intracellular cysteine protease inhibitors: High-level secretion and uptake of cystatin C in human neuroblastoma cells. *Biochimie* **92**: 1625–1634.

Wang, B., Sun, J., Kitamoto, S., Yang, M., Grubb, A., Chapman, H.A., *et al.* (2006) Cathepsin S controls angiogenesis and tumor growth via matrix-derived angiogenic factors. *J Biol Chem* **281**: 6020–6029.

Wang, G., Li, X., and Wang, Z. (2009) APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Res* **37**: D933–D937.

Wang, Y., Rosen, H., Madtes, D.K., Shao, B., Martin, T.R., Heinecke, J.W., and Fu, X. (2007) Myeloperoxidase inactivates TIMP-1 by oxidizing its N-terminal cysteine residue: an

oxidative mechanism for regulating proteolysis during inflammation. *J Biol Chem* **282**: 31826–31834.

Wang, Z., Zheng, T., Zhu, Z., Homer, R.J., Riese, R.J., Chapman, H.A., *et al.* (2000) Interferon gamma induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung. *J Exp Med* **192**: 1587–1600.

Wattiaux, R., Wattiaux-de Coninck, S., Thirion, J., Gasingirwa, M.-C., and Jadot, M. (2007) Lysosomes and Fas-mediated liver cell death. *Biochem J* **403**: 89–95.

Weiner, D.J., Bucki, R., and Janmey, P.A. (2003) The Antimicrobial Activity of the Cathelicidin LL37 Is Inhibited by F-actin Bundles and Restored by Gelsolin. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**: 738–745.

Weldon, S., McNally, P., McAuley, D.F., Oglesby, I.K., Wohlford-Lenane, C.L., Bartlett, J.A., *et al.* (2014) miR-31 dysregulation in cystic fibrosis airways contributes to increased pulmonary cathepsin S production. *Am J Respir Crit Care Med* **190**: 165–174.

Weldon, S., and Taggart, C.C. (2007) Innate host defense functions of secretory leucoprotease inhibitor. *Exp Lung Res* **33**: 485–491.

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

Wiedow, O., Harder, J., Bartels, J., Streit, V., and Christophers, E. (1998) Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **248**: 904–909.

Wiesner, J., and Vilcinskas, A. (2010) Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system. *Virulence* **1**: 440–464.

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

Wijkstrom-Frei, C., Chemaly, S. El-, Ali-Rachedi, R., Gerson, C., Cobas, M.A., Forteza, R., *et al.* (2003) Lactoperoxidase and human airway host defense. *Am J Respir Cell Mol Biol* **29**: 206–212.

Williams, A.S., Eynott, P.R., Leung, S.-Y., Nath, P., Jupp, R., Sanctis, G.T. De, *et al.* (2009) Role of cathepsin S in ozone-induced airway hyperresponsiveness and inflammation. *Pulm Pharmacol Ther* **22**: 27–32.

Williams, S.E., Brown, T.I., Roghanian, A., and Sallenave, J.-M. (2006) SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clin Sci* **110**: 21–35.

Wimley, W.C., Selsted, M.E., and White, S.H. (1994) Interactions between human defensins and lipid bilayers: evidence for formation of multimeric pores. *Protein Sci* **3**: 1362–1373.

Wolters, P.J., Raymond, W.W., Blount, J.L., and Caughey, G.H. (1998) Regulated expression, processing, and secretion of dog mast cell dipeptidyl peptidase I. *J Biol Chem* **273**: 15514–15520.

Wright, J.R. (2005) Immunoregulatory functions of surfactant proteins. *Nat Rev Immunol* **5**: 58–68.

Wu, H., Kuzmenko, A., Wan, S., Schaffer, L., Weiss, A., Fisher, J.H., *et al.* (2003) Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. *J Clin Invest* **111**: 1589–1602.

X

Xia, L., Kilb, J., Wex, H., Li, Z., Lipyansky, A., Breuil, V., *et al.* (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.

Xiao, C., Puddicombe, S.M., Field, S., Haywood, J., Broughton-Head, V., Puxeddu, I., *et al.* (2011) Defective epithelial barrier function in asthma. *J Allergy Clin Immunol* **128**: 549–556.e1–12.

Xiao, W., Hsu, Y.-P., Ishizaka, A., Kirikae, T., and Moss, R.B. (2005) Sputum cathelicidin, urokinase plasminogen activation system components, and cytokines discriminate cystic fibrosis, COPD, and asthma inflammation. *Chest* **128**: 2316–2326.

Y

Yamaguchi, S., Hong, T., Waring, A., Lehrer, R.I., and Hong, M. (2002) Solid-state NMR investigations of peptide-lipid interaction and orientation of a beta-sheet antimicrobial peptide, protegrin. *Biochemistry* **41**: 9852–9862.

Yamaguchi, S., Huster, D., Waring, A., Lehrer, R.I., Kearney, W., Tack, B.F., and Hong, M. (2001) Orientation and dynamics of an antimicrobial peptide in the lipid bilayer by solid-state NMR spectroscopy. *Biophys J* **81**: 2203–2214.

Yamasaki, K., Schaubert, J., Coda, A., Lin, H., Dorschner, R.A., Schechter, N.M., *et al.* (2006) Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin. *FASEB J* **20**: 2068–2080.

Yamazoe, M., Nishitani, C., Takahashi, M., Katoh, T., Ariki, S., Shimizu, T., *et al.* (2008) Pulmonary surfactant protein D inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory cell responses by altering LPS binding to its receptors. *J Biol Chem* **283**: 35878–35888.

Yanamandra, N., Gumidyala, K.V., Waldron, K.G., Gujrati, M., Olivero, W.C., Dinh, D.H., *et al.* (2004) Blockade of cathepsin B expression in human glioblastoma cells is associated with suppression of angiogenesis. *Oncogene* **23**: 2224–2230.

Yang, D., Chen, Q., Hoover, D.M., Staley, P., Tucker, K.D., Lubkowski, J., and Oppenheim, J.J. (2003) Many chemokines including CCL20/MIP-3alpha display antimicrobial activity. *J Leukoc Biol* **74**: 448–455.

Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S.N., Chen, Q., Buffo, M.J., Shogan, J., *et al.* (1999) Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* **286**: 525–528.

Yang, D., Chertov, O., and Oppenheim, J.J. (2001) Participation of mammalian defensins and cathelicidins in anti-microbial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37). *J Leukoc Biol* **69**: 691–697.

Yang, H., and Ma, T. (2015) F508del-cystic fibrosis transmembrane regulator correctors for treatment of cystic fibrosis: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 1–12.

Yang, L., Harroun, T.A., Heller, W.T., Weiss, T.M., and Huang, H.W. (1998) Neutron off-plane scattering of aligned membranes. I. Method Of measurement. *Biophys J* **75**: 641–645.

Yang, L., Harroun, T.A., Weiss, T.M., Ding, L., and Huang, H.W. (2001) Barrel-stave model or toroidal model? A case study on melittin pores. *Biophys J* **81**: 1475–1485.

Yang, L., Weiss, T.M., Lehrer, R.I., and Huang, H.W. (2000) Crystallization of Antimicrobial Pores in Membranes: Magainin and Protegrin. *Biophys J* **79**: 2002–2009.

Yang, M., Sun, J., Zhang, T., Liu, J., Zhang, J., Shi, M.A., *et al.* (2008) Deficiency and inhibition of cathepsin K reduce body weight gain and increase glucose metabolism in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **28**: 2202–2208.

Yan, S., Berquin, I.M., Troen, B.R., and 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.

Yasuda, Y., Li, Z., Greenbaum, D., Bogoy, 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.

Yeaman, M.R., and Yount, N.Y. (2003) Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and Resistance. *Pharmacol Rev* **55**: 27–55.

Yi, M., Kaneko, S., Yu, D.Y., and Murakami, S. (1997) Hepatitis C virus envelope proteins bind lactoferrin. *J Virol* **71**: 5997–6002.

Yoshimura, K., Toibana, A., and Nakahama, K. (1988) Human lysozyme: sequencing of a cDNA, and expression and secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **150**: 794–801.

Yount, N.Y., and Yeaman, M.R. (2004) Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proc Natl Acad Sci* **101**: 7363–7368.

Yu, J., Mookherjee, N., Wee, K., Bowdish, D.M.E., Pistolic, J., Li, Y., *et al.* (2007) Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1 β , augments immune responses by multiple pathways. *J Immunol* **179**: 7684–7691.

Z

Zahraoui, A. (2004) [Tight junctions, a platform regulating cell proliferation and polarity]. *Médecine Sci* **20**: 580–585.

Zahraoui, A., Louvard, D., and Galli, T. (2000) Tight junction, a platform for trafficking and signaling protein complexes. *J Cell Biol* **151**: F31–36.

- Zaiou, M., Nizet, V., and Gallo, R.L. (2003) Antimicrobial and Protease Inhibitory Functions of the Human Cathelicidin (hCAP18/LL-37) Prosequence. *J Invest Dermatol* **120**: 810–816.
- Zalacain, R., Sobradillo, V., Amilibia, J., Barrón, J., Achótegui, V., Pijoan, J.I., and Llorente, J.L. (1999) Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* **13**: 343–348.
- Zanetti, M. (2004) Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *J Leukoc Biol* **75**: 39–48.
- Zang, L.Y., Stone, K., and Pryor, W.A. (1995) Detection of free radicals in aqueous extracts of cigarette tar by electron spin resonance. *Free Radic Biol Med* **19**: 161–167.
- Zani, M.-L., Tanga, A., Saidi, A., Serrano, H., Dallet-Choisy, S., Baranger, K., and Moreau, T. (2011) SLPI and trappin-2 as therapeutic agents to target airway serine proteases in inflammatory lung diseases: current and future directions. *Biochem Soc Trans* **39**: 1441–1446.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**: 389–395.
- Zeeuwen, P.L.J.M., Cheng, T., and Schalkwijk, J. (2009) The biology of cystatin M/E and its cognate target proteases. *J Invest Dermatol* **129**: 1327–1338.
- Zhang, D., Huang, C., Yang, C., Liu, R., Wang, J., Niu, J., and Bromme, 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., *et al.* (2000) Two-chain high molecular weight kininogen induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis: partial activity within domain 5. *FASEB J* **14**: 2589–2600.
- Zhang, W., Case, S., Bowler, R.P., Martin, R.J., Jiang, D., and Chu, H.W. (2011) Cigarette smoke modulates PGE(2) and host defence against *Moraxella catarrhalis* infection in human airway epithelial cells. *Respirol Carlton Vic* **16**: 508–516.
- Zhao, C., Ganz, T., and Lehrer, R.I. (1995) Structures of genes for two cathelin-associated antimicrobial peptides: prophenin-2 and PR-39. *FEBS Lett* **376**: 130–134.
- Zheng, T., Zhu, Z., Wang, Z., Homer, R.J., Ma, B., Riese, R.J., *et al.* (2000) Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest* **106**: 1081–1093.
- Zhu, S., Kachel, D.L., Martin, W.J., and Matalon, S. (1998) Nitrated SP-A does not enhance adherence of *Pneumocystis carinii* to alveolar macrophages. *Am J Physiol* **275**: L1031–1039.
- Ziady, A.G., and Hansen, J. (2014) Redox balance in Cystic Fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* **52**: 113–123.

Annexes

Annexe 1

Antimicrobial Proteins and Peptides in Human Lung Diseases: A Friend and Foe Partnership with Host Proteases.

F. Lecaille, G. Lalmanach & P.M. Andrault (2015)

Biochimie, DOI : 10.1016/j.biochi.2015.08.014



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

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

Review

Antimicrobial proteins and peptides in human lung diseases: A friend and foe partnership with host proteases

Fabien Lecaille^{*}, Gilles Lalmanach, Pierre-Marie Andrault

INSERM, UMR 1100, Pathologies Respiratoires: Protéolyse et Aérosolthérapie, Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires, Equipe 2: « Mécanismes Protéolytiques dans l'Inflammation », Université François Rabelais, F-37032 Tours cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 July 2015

Accepted 31 August 2015

Available online xxx

Keywords:

Antimicrobial peptides and proteins

Proteases

Inhibitors

Lung

Chronic obstructive pulmonary disease

Cystic fibrosis

Asthma

ABSTRACT

Lung antimicrobial proteins and peptides (AMPs) are major sentinels of innate immunity by preventing microbial colonization and infection. Nevertheless bactericidal activity of AMPs against Gram-positive and Gram-negative bacteria is compromised in patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), cystic fibrosis (CF) and asthma. Evidence is accumulating that expression of harmful human serine proteases, matrix metalloproteases and cysteine cathepsins is markedly increased in these chronic lung diseases. The local imbalance between proteases and protease inhibitors compromises lung tissue integrity and function, by not only degrading extracellular matrix components, but also non-matrix proteins. Despite the fact that AMPs are somewhat resistant to proteolytic degradation, some human proteases cleave them efficiently and impair their antimicrobial potency. By contrast, certain AMPs may be effective as antiproteases. Host proteases participate in concert with bacterial proteases in the degradation of key innate immunity peptides/proteins and thus may play immunomodulatory activities during chronic lung diseases. In this context, the present review highlights the current knowledge and recent discoveries on the ability of host enzymes to interact with AMPs, providing a better understanding of the role of human proteases in innate host defense.

© 2015 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

Contents

1. Introduction	00
2. AMPs in the airway	00
2.1. Structure, expression and antimicrobial activity	00
2.1.1. Lysozyme and lactoferrin	00

Abbreviations: α 1-AT, α 1-antitrypsin; AMP, antimicrobial peptide and protein; ASL, airway surface liquid; BALF, broncho alveolar lavage fluid; BM, basement membrane; Cat, cathepsin; CF, cystic fibrosis; CFTR, cystic fibrosis transmembrane regulator; CLD, cathelin-like domain; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; CRD, carbohydrate recognition domain; GAG, glycosaminoglycan; GOLD, global initiative for lung diseases; ECM, extracellular matrix; HBD, human beta-defensin; hCAP, human cathelicidin antimicrobial peptide; HMWK, high molecular weight kininogen; HNE, human neutrophil elastase; HNP, human neutrophil peptides; LMWK, low molecular weight kininogen; LPS, lipopolysaccharide; MHC, major histocompatibility complex; MMP, matrix metalloprotease; NSP, neutrophil serine protease; SLPI, secretory leucocyte protease inhibitor; SP, surfactant protein; SPLUNC1, short palate lung and nasal epithelium clone 1; TLR, toll-like receptor; TIMP, tissue inhibitor of metalloproteases; TNF, tumor necrosis factor.

^{*} Corresponding author. INSERM, UMR 1100, «Pathologies Pulmonaires: Protéolyse et Aérosolthérapie», CEPR, Université François Rabelais, Faculté de Médecine, 10 Boulevard Tonnellé, F-37032 Tours cedex, France.

E-mail address: fabien.lecaille@univ-tours.fr (F. Lecaille).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.08.014>

0300-9084/© 2015 Elsevier B.V. and Société Française de Biochimie et Biologie Moléculaire (SFBBM). All rights reserved.

2.1.2.	Secretory leucocyte protease inhibitor (SLPI)	00
2.1.3.	Elafin	00
2.1.4.	Defensins	00
2.1.5.	Cathelicidin (LL-37/hCAP-18)	00
2.1.6.	Surfactant protein A and D (SP-A and SP-D)	00
2.1.7.	Miscellaneous	00
2.2.	Regulation of AMPs in CF, COPD and asthma	00
2.2.1.	Cystic fibrosis	00
2.2.2.	Chronic obstructive pulmonary disease (COPD)	00
2.2.3.	Asthma	00
3.	Regulation of human proteases and inhibitors in CF, COPD and asthma	00
3.1.	Serine proteases and their inhibitors	00
3.2.	Matrix metalloproteases and their inhibitors	00
3.3.	Cysteine cathepsins and their inhibitors	00
4.	An ambiguous companionship between AMPs and human proteases	00
4.1.	Susceptibility of AMPs to proteolytic degradation	00
4.1.1.	Collectins SP-A and SP-D	00
4.1.2.	LL-37/hCAP-18	00
4.1.3.	Lactoferrin, lysozyme, HBD-2 and -3, and SLPI	00
4.2.	The Janus face of AMPs: inhibitors of proteases	00
5.	Concluding remarks	00
	Conflict of interest	00
	Acknowledgments	00
	References	00

1. Introduction

During inhalation of the inspired air (8000–15,000 L daily), the upper respiratory tract is continually exposed to the outside environment that contains a myriad of microorganisms (10^4 – 10^6 bacteria per m^3) [1]. The integrity of the human respiratory tract relies on the multi-component host defense system that involves structural, physical and functional mechanisms (innate and adaptive immune systems) against colonization by pathogenic microorganisms [2]. In the normal lung, in concert to the mucociliary clearance of inhaled microbes and production of chemokines and cytokines, the release of a large variety of antimicrobial peptides and proteins (AMPs) (e.g. cathelicidins, defensins, lysozyme, secretory leukocyte protease inhibitor, lactoferrin, collectins, elafin, mucins) into the lumen of the airways, constitutes one of the first line of defense against pathogens. Because of their multiple roles in innate immunity (host defense, inflammation, tissue regeneration), AMPs are increasingly studied [3–8]. Despite this formidable arsenal, failure of the host defenses may occur in pulmonary diseases including cystic fibrosis (CF), chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and asthma. Actually, several AMPs that are known to be resistant to proteolysis are degraded and inactivated not only by bacterial proteases [9] but also by host proteases. Host proteases fulfill basic homeostatic tasks and participate positively to the processing of numerous components as well as in the repair and turnover of the extracellular matrix and basement membrane in lungs (for review: [10–12]). However, an imbalance of proteases-antiproteases network in favor to proteolysis is observed under pathophysiological conditions, which contributes to tissue injury and can dampen the antimicrobial activity of AMPs. First, we will give an overview on the most abundant airway AMPs (LL-37/hCAP-18, β -defensins, lactoferrin, lysozyme, SLPI, elafin, surfactant proteins SP-A and SP-D) and their regulation in human lung diseases including CF, COPD and asthma. Then, after a brief outline of pulmonary human proteases (with an emphasis on cysteine cathepsins) and their endogenous inhibitors, we will focus on the ability of these host enzymes to interact with AMPs. The aim of this review is to provide updated informations that may help to better

understand the role of human proteases in innate host defense.

2. AMPs in the airway

Antimicrobial peptides and proteins (AMPs) constitute the most ancient and major weapon of host innate immune defense against different pathogenic microorganisms, including Gram-positive and -negative bacteria, viruses, fungi, parasites and tumor cells [13]. AMPs families consist of a diverse collection of peptides and proteins (~2500 AMPs have been reported up to now) that have been described in plants, insects, invertebrates and vertebrates (for review: [7,13–17]).

Major components of the airway surface liquid (ASL) with antimicrobial activity are peptides such as β -defensins, LL-37/CAP-18 or larger molecules, including lysozyme, lactoferrin, secretory phospholipase A2, elafin, secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and the surfactant proteins A and D [18]. Other substances such as mucins and the chemokine ligand CCL20 (also known as LARC and MIP-3 α) contribute to the host defense [19,20]. AMPs act generally against microorganisms by disrupting the membrane integrity of pathogens, via different processes as detailed elsewhere [14,21].

2.1. Structure, expression and antimicrobial activity

Due to their large diversity, it is difficult to classify AMPs according to their origin or their mode of action. Nevertheless, AMPs share some common features. Most AMPs are amphipathic molecules with spatially separated clusters of hydrophobic and hydrophilic amino acids. In mammals, AMPs act against various microbes such as Gram-negative and Gram-positive bacteria, protozoa, fungi and some viruses. AMPs are involved in the aggregation, trapping and killing of pathogens and also play key immunomodulatory roles. AMPs have multiple ways to protect the host against these microorganisms, one of which relies on the cationic nature and the secondary structure of the peptides [22]. Nascent AMPs are synthesized as a pre-propeptide that possesses a N-terminal signal sequence for translocation to the endoplasmic reticulum, a

Table 1
Structure, expression, concentration, regulation and antimicrobial activity of lung AMPs. Antimicrobial activity is noted: G+/–, Gram-positive and -negative bacteria; F, fungi; V, viruses; P, parasites.

AMPs	Mw ^a (kDa)	pI/Net charge ^a	Expression	Lung fluids physiological concentration	Regulation	Activity	Ref.
Lysozyme	14.3	10.5 +8	Neutrophils (secondary granules), monocytes, macrophages, airway epithelial cells	20–70 µM	Constitutive	G+, G–, F	[29–32,37]
Lactoferrin	78.2	8.5 +11	Neutrophils (secondary granules), submucosal gland epithelial cells	1–10 µM	Constitutive	G+, G–, F, V, P	[29–32,39]
Elafin	6	8.5 +3	Alveolar macrophages, neutrophils, Clara cells, type II pneumocytes, bronchial epithelial cells	1.5–4.5 µM	Induced by IL-1β, TNF-α, LPS, HNE	G+, G–, F, V	[66–68,72]
α-defensins (HNP 1–3)	~3.4	8.3–8.7 +2 to +3	Neutrophils (azurophilic granules)	~1 µM	Constitutive	G+, G–, F, V, P	[75–77]
SLPI	11.7	9.1 +12	Alveolar macrophages, neutrophils, Clara cells, Goblet cells	~0.5 µM	Constitutive, upregulated by HNPβ, TNF-α, LPS, HNE	G+, G–, F, V	[48–55]
LL-37	4.5	10.6 +6	Neutrophils (secondary granules), alveolar macrophages, bronchial and submucosal gland epithelial cells	0.5–10 nM	Constitutive, upregulated by vitamin D, TNF-α, IFN-γ, IL-17A	G+, G–, F, V, P	[86,87,89,91–96]
SP-A (monomer)	34	5.0 (CRD) –3 (CRD)	Type II pneumocytes, Clara cells	1–5 nM	Constitutive, upregulated by glucocorticoids (low concentrations), IL-1, IL-4, IFN-γ, TNF-α	G–, F	[108–115]
SP-D (monomer)	43	4.7 (CRD) –5 (CRD)					
β-defensins (HBD 1–3)	3.9–5.2	8.9–10.1 +4 to +11	Bronchial, submucosal gland epithelial cells	0.2–2 nM	HBD-1: constitutive, upregulated by IFN-γ HBD-2: inducible by IL-1β, IL-17, TNF-α HBD-3: inducible by IL-1β, IL-6, IFN-γ	G+, G–, F, V	[78,83–85]

^a Calculated according to amino-acid sequence (www.expasy.org/protparam/).

prosegment and a C-terminal cationic peptide. After intracellular trafficking, the prosegment is cleaved off to release the mature peptide into the extracellular space [13]. Human AMPs can be grouped according to their size (peptides or proteins), amphiphilic conformations (α-helices or β-sheets) or their particular amino acid compositions (e.g. proline-rich or histidine-rich AMPs). AMPs are divided into five sub-categories: the first subgroup is composed of small anionic peptides that contain regions of 5–7 Asp residues, such as dermcidin (DCD1). They are found in mM concentrations in surfactant extracts, BALF and airway epithelial cells [14,23]. The second includes cationic peptides with a linear α-helix (LL-37/hCAP-18) [24,25]. The third group contains peptides with Cys residues forming intramolecular disulfide bridges and β sheets (defensins). The fourth group contains linear peptides with a large repetition of one or two amino acids, for example His residues from salivary histatins. The last group is comprised of charged peptides derived from the digestion of larger peptides/proteins (for example lactoferricin from lactoferrin or hemocidins from α- and β-globin chains [26,27]). A variety of cell types lining the lung synthesize and secrete these mediators [7], and their expression is inducible upon recognition of pathogens and modulated locally by inflammatory stimuli (Table 1) [28].

2.1.1. Lysozyme and lactoferrin

Lysozyme and lactoferrin are the two most abundant antibacterial proteins found in airways (Table 1). Their estimated concentrations in sputum and in bronchial lavage range from 0.25 to 1 mg/ml [29–32]. Neutrophil granules are the major source of both molecules. Lung epithelial cells, monocytes and macrophages also secrete lysozyme. Correlation has been observed between the increase of lysozyme production in ASL from transgenic mice and the antimicrobial activity *in vivo* [33]; moreover the depletion of lysozyme from human nasal secretions leads to a significant reduction of antimicrobial activity [34].

Lysozyme that has been first described by Fleming [35] can damage bacteria either by a specific cleavage in the glycosidic bonds of the bacterial cell wall peptidoglycans or by a non-enzymatic mechanism [36]. Lysozyme is a basic 14.3 kDa protein with a pI of 10.5 and which was the first-ever X-ray crystal structure of an enzyme determined [37]. Lysozyme is divided into two domains with the active site located in the cleft. One domain contains mainly α-helical regions while the other consists almost entirely of β-sheet structures. Four disulfides bonds are present thereby stabilizing the tertiary structure of the enzyme and making it compact and heat stable [38]. Lysozyme activity is inhibited by small saccharides that compete with the natural substrate but is also inactivated in the presence of reducing agents and oxidative stress that split the disulfide linkages especially the one located nearby the active site.

Lactoferrin is an ~80 kDa cationic iron binding glycoprotein (pI of 8.5) and 3-D structure consists of two homologous domains (N- and C-domains), which both contain an iron (Fe³⁺, ferric ion)-binding pocket [39]. Like other cationic AMPs, lactoferrin binds to negatively-charged molecules glycosaminoglycans or GAGs, DNA and various cell surface molecules, such as LPS and lipoteichoic acid from the outer membrane of Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively, which leads to microbial injury and death [40–43]. The Arg-rich 17-mer N-terminus is responsible for this activity. The tight binding affinity of lactoferrin to iron is also essential, via the partial depletion of free iron, a crucial nutrient for bacteria in the medium [44,45]. One characteristic of neutrophil-specific granule deficiency (SGD, also known as lactoferrin deficiency) that is a rare congenital disorder is the lack of both lactoferrin and human neutrophil peptides (HNPs, α-defensins). A major clinical feature is an increased susceptibility of patients to pyogenic

infections in lungs [46,47].

2.1.2. Secretory leucocyte protease inhibitor (SLPI)

SLPI is a 11.7 kDa cationic, non glycosylated serine protease inhibitor that is constitutively found in respiratory secretions and chiefly expressed in the upper respiratory tract (for review: [48]). SLPI concentration is less abundant in comparison to lysozyme and lactoferrin, and ranges from 0.1 to 2 µg/ml in airway lavage liquid and 2.5 µg/ml in nasal secretions [49–51] (Table 1). SLPI is produced in the lung by numerous cell types, including neutrophils, macrophages, clara cells, goblet cells and the epithelial cells present at the mucosal surface [52]. Various stimuli like LPS, neutrophil elastase, and pro-inflammatory cytokines may modulate the expression of SLPI [53]. SLPI that is a highly basic protein (pI of 9.1) consists of 107 amino acids organized into two homologous WAP (whey acidic protein) domains assembled in a boomerang-like shape, each domain containing four disulfide bonds (Wap Four Disulfide Core, WFDC) [54,55]. This compact molecule is acid-stable, resistant to proteolysis but labile at alkaline pH [56]. The N-terminal part of SLPI interacts with heparan sulfate, whereas the C-terminal domain comprises the anti-human neutrophil elastase (anti-HNE) site ($K_i = 1.10^{-11}$ M) [57]. SLPI is also a potent reversible inhibitor of other serine proteases including cathepsin G (Cat G), trypsin, chymotrypsin and mast cell chymase, with an inhibition constant in the nanomolar range [58,59]. In addition to its anti-protease activity, SLPI displays potent antibacterial activities (e.g. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Staphylococcus aureus*) and inhibits the growth of fungi such as *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* [60–62]. SLPI shows also some antiviral activity; it may inhibit human immunodeficiency virus replication by blocking viral DNA synthesis, and prevent its entry into the cells by interacting with annexin-II [63,64]. Interestingly, infection of airway epithelial cells by *S. aureus* induced a dose-dependent decrease of secreted SLPI [65]. Overall, antimicrobial properties of SLPI rely mainly on its N-terminal domain (net charge: +7) that is more cationic than the C-terminal domain (net charge: +5). Nevertheless, intact SLPI presents higher antimicrobial activity compared with isolated N-terminal and C-terminal domains tested individually or together [60].

2.1.3. Elafin

Another important antiprotease secreted by lung epithelium is elafin, a cationic 6 kDa non-glycosylated serine antiprotease, belonging to the chelonianin family [66]. High levels of elafin are found in bronchial secretions, and this molecule may correspond up to 20% of the total anti-elastase activity found in BALFs from healthy individuals [66–68] (Table 1). Elafin is released by proteolytic processing from a larger precursor composed of two functional domains called trappin-2 (or pre-elafin). The C-terminal WFDC domain is homologous with the C-terminal domain of SLPI and shares antiprotease properties. The N-terminal domain encompasses a characteristic cementoin domain containing repeating GQDPVK sequence. This sequence is necessary to form polymers of elafin and also to bind to other interstitial molecules by transglutamination. Several forms of elafin are found in lung secretions, including the native molecule (~10 kDa in SDS-PAGE), proteolytic fragments of elafin (<6 kDa) and a higher complex of elafin (~50 kDa) [68]. Elafin is a basic molecule (pI of 8.5), with an unusual stability at acidic pH. The structural compactness of elafin depends on four conserved disulphide bonds. Despite elafin shares 40% sequence identity with SLPI, the protease inhibitory domain is identical except for the P1 residue (Ala for elafin vs Leu for SLPI). This single mutation may explain why elafin has a more specific spectrum of inhibition than SLPI [69], since elafin inhibits proteinase 3 (Pr3) but not trypsin, chymotrypsin or Cat G [70,71]. Elafin

displays potent antibacterial and antifungal activities against *P. aeruginosa* and *S. aureus* as well as *C. albicans* and *A. fumigatus*. As reported for SPLI, its expression is regulated by LPS, neutrophil elastase and pro-inflammatory cytokines [72].

2.1.4. Defensins

Two major and widely distributed families of cationic AMPs of the respiratory tract are defensins and cathelicidins. Both are amphipathic peptides with hydrophobic and hydrophilic properties, conferring antimicrobial activity against a broad range of microbial threats [73]. Human α - and β -defensins are small (~4 kDa) and basic (pI of 8.3–10) peptides with six cysteine residues forming three disulfide bonds. These bridges are essential both for the structural compactness and for the unusual resistance to proteolysis of defensins. Both α - and β -defensins share a common motif termed the γ -core, which is composed of two antiparallel β -sheets with an interposed short turn region [74]. Human α -defensins are 29–35 amino acids in length and include six members, which are mainly produced by neutrophils. Four members, named human neutrophil peptides 1–4 (HNP-1 to HNP-4) because the first α -defensin was isolated from neutrophils [75] are mostly found in the azurophilic granules, HNP-1, HNP-2 and HNP-3 being the most abundant [76,77]. The α -defensins are also expressed in other myeloid cells including B lymphocytes, monocytes and NK cells [78]. The two other α -defensins are human defensins 5 and 6 (HD-5 and HD-6), and are primarily expressed in secretory granules of intestinal Paneth's cells and epithelial cells of the female urogenital tract. Nevertheless, a low level of HD-5 could be found in respiratory epithelial cells and mucus [79]. Overexpression of HD-5 in a transgenic murine model ensured a potent immunity against enteric salmonellosis [80]. More than twenty-eight β -defensins have been identified; among them eleven β -defensins are expressed in human (for review: [81,82]). Human β -defensins (HBDs) differ slightly from α -defensins by the arrangement of the disulfide bridges. β -defensins are 36–50 amino-acids, with 5–8 positively charged residues. HBD-1 to HBD-4 are the most abundant β -defensins in human airway secretions (ng/ml range) [78,83,84] (Table 1). HBD-1 is constitutively expressed in the epithelial cells of respiratory tract, HBD-2, -3, and -4 are triggered by pathogens or proinflammatory mediators such as TNF and IL-1 β [85]. Human β -defensins contribute to innate immunity by direct antimicrobial activity and their expression levels correlate with host defense against infection in lung diseases.

2.1.5. Cathelicidin (LL-37/hCAP-18)

Cathelicidins (concentration range: ng/ml) [86,87] are cationic peptides that are synthesized as precursors consisting of a conserved N-terminal cathelin (acronym of cathepsin L inhibitor)-like domain, and a C-terminal antimicrobial domain, which shows some heterogeneity in the amino acid sequence, size and secondary structure among species (for review: [88]). The only human cathelicidin is named LL-37/hCAP-18 and is produced by myeloids cells, keratinocytes, epithelial cells, neutrophil, macrophages and lymphocytes in the airways [86,89]. Cathelicidin LL-37/hCAP-18 is stored as a precursor form (18 kDa), and undergoes proteolytic processing by Pr3 in lungs to generate the cationic peptide LL-37 (4.5 kDa, pI: 10.6) (an abbreviation that stands for the presence of 37 amino acids and the two leucines at its N-terminus) secreted into the ASL [90]. Like HBD-2, -3, and -4, LL-37 expression in lungs is triggered by pathogens and inflammatory mediators [91–94]. LL-37 presents a broad bactericidal activity toward both Gram-positive and Gram-negative bacteria (Table 1). LL-37 deficient mice are more susceptible to infection by Group A *Streptococcus* [95]. Conversely, the over-expression of LL-37 in a murine model reduces significantly the bacterial burden of *P. aeruginosa*

[96]. The central positively-charged region of LL-37 is crucial for antimicrobial activity by establishing electrostatic interactions with the membrane of bacteria [97]. As a result, negatively-charged molecules including DNA, GAGs and F-actin may impair the antimicrobial potency of LL-37 [96,98]. Another mechanism has been proposed, e.g. LL-37 citrullination, which may not only inactivate its bactericidal activity but alters also its immunoregulatory properties [99,100]. In addition, citrullinated LL-37 was more prone to degradation by bacterial proteases compared with native LL-37. Arg residues within LL-37 are easily citrullinated by peptidylarginine deiminases that are enzymes present alongside the peptide at infected/inflammatory sites, as found in lung tissue of individuals suffering from COPD. Beside LL-37, the human cathelin-like moiety that displays two intramolecular disulfide bonds in its C-terminal region, demonstrates also a potent antimicrobial activity [101]. Recently, additional protective activities have been attributed to LL-37 such as strengthening the epithelial defense barrier by selectively upregulating the expression of several tight junction proteins (i.e. claudins and occludin) [102]. Furthermore, despite LL-37 loses its antimicrobial activity when bound to DNA, it participates in the formation and the stability of neutrophils extracellular traps (NETs), which are involved in host defense against Gram-positive and Gram-negative bacteria [103,104]. NETs comprise DNA, histones, granule proteins and AMPs including LL-37, that are commonly present in the sputum of patients with cystic fibrosis [105], and which can be activated by different stimuli such as pathogens, pro-inflammatory cytokines, LPS or phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA).

2.1.6. Surfactant protein A and D (SP-A and SP-D)

The lung surfactant proteins SP-A and SP-D belong to collectins, a group of related proteins important for opsonizing bacterial pathogens and to modulate the surface tension in alveoli during respiration. SP-A and SP-D are hydrophilic lipoproteins, produced principally by airway submucosal cells, alveolar type II pneumocytes and non-ciliated respiratory epithelial (Clara) cells and are present in the extracellular and intra-alveolar space. Both collectins share a common structure including a globular C-terminal lectin domain with calcium-dependent carbohydrate binding capacity (CRD) and a triple helical collagen like-domain at the N-terminal. The lectin domain can bind to oligosaccharides present on the surface of microorganisms, virus, and non encapsulated fungi (for review: [106]). In the presence of calcium, SP-A and SP-D bind to a variety of monosaccharides including mannose, fucose, glucose, and galactose. Nevertheless, contrary to SP-D, SP-A binds strongly to dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC), the major phospholipid in surfactant [107]. Monomeric SP-A (~34 kDa) and SP-D (~43 kDa) are assembled as oligomers of trimer subunits. SP-A can self-associate to form octadecamers (six trimeric subunits) composed of six-disulfide-linked trimers that are aligned in a bouquet-like shape at the C-terminus. SP-D is assembled as dodecamers at their amino-termini, covalently linked by disulfide bonds forming a cruciform structure radiating at the periphery arrays of trimeric CRDs. SP-A is acidic (pI: 4.2–5) while SP-D is basic (pI: 5–9) and difference in net charges is predominantly located in the collagen-like domain (Table 1). The functional significance of these differences is not known. A comprehensive review on the structural and functional properties of SP-A and SP-D is reported elsewhere [108]. The expression of SP-A and SP-D is regulated by glucocorticoids and cytokines [109–113]. Beside their susceptibility to proteolysis (see the next section), oxidative metabolites, such as peroxynitrite that alters specific residues located in the CRD of SP-A, may impair the capacity of SP-A to aggregate lipids and bind microorganisms [114,115]. *In vitro* studies showed that both collectins bind and aggregate pathogens, enhancing macrophage-

dependent microbial clearance. Although distinct effects are observed between SP-D and SP-A gene-targeted mice, their deficiency confirms that both collectins are important in lung defense as reflected by the altered response to *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, and *Staphylococcus pneumoniae* [116].

2.1.7. Miscellaneous

Other human AMPs including, hepcidin, granulysin, calcitermin and short palate lung and nasal epithelium clone 1 (SPLUNC1) were reported in airway secretions but their roles have been poorly investigated [117–123]. The domain 5 (D5, light chain) of human high molecular weight kininogen (HMWK) also has potent antimicrobial activity [124], and a cationic D5-derived peptide (residues His479–His498) exerts an inhibitory activity against *E. coli* and *P. aeruginosa* similar to LL-37. Nevertheless, contrary to LL-37, the D5-derived peptide is resistant to various bacterial proteases. Interestingly, under physiological conditions, HMWK is fragmented *in vivo* by the concerted action of host and bacterial proteases, generating different bioactive AMPs, including the His479–His498 D5-derived peptide and bradykinin [14,125–127].

2.2. Regulation of AMPs in CF, COPD and asthma

The importance of the innate immune system in airways is clearly highlighted during COPD, CF and asthma. In these diseases, progressive inflammatory responses are observed in mucus and airways, with an anarchic tissue remodeling, airway obstruction and a deficiency in expiratory flow rate. AMPs that are secreted into the mucus layer overlying the epithelium are sensitive to the concentration and composition of residual electrolytes (ionic strength, pH) [128,129]. The antimicrobial activity of most of AMPs is salt-sensitive *in vitro* and is markedly hampered under isotonic and hypertonic conditions. Furthermore, levels of AMPs expression in patients with obstructive pulmonary diseases may also differ according to several criteria: i) the severity of chronic inflammation in lungs which may damage epithelial cells that produce and secrete AMPs, ii) the ability of some microorganisms to downregulate the expression of AMPs, and iii) a protease-antiprotease imbalance, favoring the cleavage and inactivation of some AMPs [130,131].

2.2.1. Cystic fibrosis

The pathogenesis of CF, an autosomal-recessive disorder, results in a defective chloride (Cl^-), bicarbonate (HCO_3^-), thiocyanate (SCN^-) and other anions transport in the airways due to the genetic defect in the cystic fibrosis transmembrane-conductance regulator (CFTR). CF affects 1/2500 births in the Caucasian population. The primary cause of morbidity and mortality in CF is progressive lung disease caused by persistent microbial colonization (most commonly *P. aeruginosa* and *S. aureus*) and chronic infection. Despite the antimicrobial activity is compromised in CF patients, the concentration of major AMPs, which are mainly released from neutrophils and other inflammatory cells, either increases or is unchanged compared to normal individuals [98,132–136] (Table 2). For instance, expression of LL-37/hCAP-18 and HBD-2, but not HBD-1, is increased in CF airways [84,87]. Also a correlation between an increased level of lysozyme and lactoferrin in BALF from CF patients and non-CF patients with inflammatory disorders was reported [135,137]. Several explanations may be accounted for the antimicrobial deficiency observed in CF; one possibility is that, according to AMPs such as β -defensins are salt-sensitive *in vitro*, their activity is presumably impaired by the high-salt content in CF airway surface liquid (ASL). However, this observation remains still controversial, due to the difficulty to assess precisely the salt-dependent ionic strength in CF and healthy ASL [83,138,139]. Moreover, HBD-2 and -3, lactoferrin, SLPI, SP-A, and SP-D are inactivated because of

Table 2
AMPs recovered from bronchoalveolar lavage and sputum of patients with COPD, CF and asthma. Levels of AMPs expression are shown as unchanged (=), significantly increased (↑) or decreased (↓), as determined by the referred study in relation to the appropriate control group.

AMP	Sample	COPD		CF	Asthma	Ref.
		Stable	Exacerbated			
α-defensins (HNP 1–3)	BAL			↑	↑	[132,169,183]
β-defensins	sputum	↑				
	BAL	HBD-2 ↑		HBD-1 ↓ HBD-2 ↑		[84,87,170,171]
LL-37/hCAP-18	sputum	HBD-2 ↑				
	BAL	↑		↑		[98,133,172–174]
SLPI	sputum	↑	↑	↑	↓	
	BAL			=	↑	[134,135,171,174,183]
Elafin	sputum	↑	↓	↑		
	BAL				↑	[171,175,183,226]
Lactoferrin	sputum	↑	↓	↓		
	BAL			↑	↑	[135,137,174,184,185]
SP-A	sputum		=		↑	
	BAL			↓	↑	[136,176,177,186]
SP-D	sputum	↑				
	BAL			=	=	
	sputum	↑=				

their susceptibility to hydrolysis by proteases of either significant CF pathogens (aureolysin of *S. aureus* and elastase of *P. aeruginosa*, for review: [9]) or host proteases (see next chapter). Another plausible explanation is the ability of negatively-charged molecules (mucins, DNA, and F-actin bundles) to bind reversibly to cationic peptides (LL-37), and thus restrict their antimicrobial activity [140,141]. Several lines of evidence reported the importance of anionic glycosaminoglycans (GAGs) in CF airway, including sulfated GAG such as heparin, heparan sulfate (HS) and chondroitin sulfate (CS) and non-sulfated hyaluronic acid (HA) (for review: [142]). Increased concentrations of HS, CS and HA were observed in bronchial cells and CF tissues [143–146], and the antimicrobial activity of LL-37 was restored in the presence of high salt concentrations, by favoring the dissociation between LL-37 and GAGs in CF BALF [98]. At last, conversely to non-CF individuals, a mild acidic pH (pH 5.8–6.6) has been reported in CF epithelium lining fluid (ELF), which may likely favor the activity of acidic proteases including cysteine cathepsins (Cat) [147,148]. While acidic pH contributes to an increase of the viscosity of mucus [149,150], it also alters binding of numerous AMPs (LL-37, HBD-1, SLPI, SP-A and SP-D) to microorganisms, likely due to conformation changes [151–154]. Moreover, under these conditions both collectins SP-A and SP-D loss their ability to bind carbohydrates, because of the pH-induced withdrawal of Ca^{2+} [155,156].

2.2.2. Chronic obstructive pulmonary disease (COPD)

COPD will be the third leading causes of morbidity and death worldwide in 2020 [157]. Although the prevalence of COPD is increasing, no treatment is currently available. Symptoms are characterized by excessive secretion of mucus, airflow limitation and a slow chronic inflammatory process, leading to a progressive deterioration of parenchyma in lungs and a loss of elasticity, called emphysema [158]. Intermittent episodes of exacerbation are recurrent and related to bacteria infection [159,160]. Meanwhile, during inflammatory episodes, activated neutrophils and macrophages release substantial amounts of active host proteases and reactive oxygen species, enhancing inflammation and the decline in lung function of COPD patients [161,162]. Exposure to smoking cigarettes is one of the major risk (80–90%) of developing COPD. Moreover, smokers are more prone to bacterial infections than non-smokers [163]. Interestingly, mice model exposed to a combination of cigarette extract and bacterial compounds developed COPD symptoms that compared to those of human patients [164]. About

30–40% of patients with stable COPD are mainly colonized in the airways by pathogenic bacteria such as *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *M. catarrhalis* and *H. influenzae* [165–167]. Despite the mucociliary clearance is impaired together with excess of mucus production [168], levels of most lung AMPs (lysozyme, lactoferrin, surfactant proteins SP-A and SP-D, SLPI, and LL-37) are increased in the sputum of patients with stable COPD compared with healthy individuals [133,169–177] (Table 2). Similarly, sputum LL-37 also raised during exacerbation episodes contrary to SLPI and elafin levels, which may contribute to the overexpression of active HNE during lung inflammation [134]. Moreover, the expression of β-defensins is reduced with long term smoking [178].

2.2.3. Asthma

Asthma is a chronic inflammatory disease characterized by airflow limitation and associated with extracellular matrix remodeling. Contrary to COPD, airways obstructions are variable and likely reversible. Several cell types (mast cells, neutrophils and eosinophils) are activated in asthma, which is accompanied by the spread of Th2-cells with excessive cytokine production [179]. About 300 million people worldwide are asthmatic [180] and commonly treated by a combination of inhaled corticosteroids and long-acting β₂-agonists. Nevertheless, a poor response to treatment is observed for about 5–10% of asthmatic patients with severe disease [181], and exacerbation phases are responsible for much of the mortality and morbidity in asthma. Despite a lower concentration of LL-37/hCAP-18 is found in sputum of patients with asthma compared to CF and COPD patients [133], studies related to the role of AMPs in asthma remain occasional because bacterial infections are less common compared to CF and COPD [133,182–186] (Table 2). *Haemophilus* spp., *Pseudomonas* spp., and *Klebsiella* spp. are the primary Gram-negative pathogens found in the bronchi of asthmatic patients [187], and changes in lung microbiome could play a key role in progression of asthma exacerbations [188].

3. Regulation of human proteases and inhibitors in CF, COPD and asthma

Equilibrated regulation of host proteases contributes to effective host defense against bacteria, without damaging lung function and tissue integrity. The principal classes of human proteases expressed in lung are the serine, metallo-, and cysteine-proteases. These proteases are present either intracellularly or extracellularly as an

inactive proforms and/or active forms. They regulate diverse physiological events such as, to name a few, tissue remodeling, mucin expression, precursor processing, and bacterial killing. In chronic inflammatory lung diseases, the initiation and propagation of lung damage is characterized by chronic inflammation, driven by recruitment of immune cells (neutrophils, macrophages) into airways, which includes the release of active MMPs, serine, aspartyl, and cysteine proteases (cysteine cathepsins) and leukocyte-derived cytotoxic products into the extracellular space following cell activation. Although undoubtedly crucial in lung homeostasis, growing evidences indicate that excessive production and secretion of uncontrolled active proteases in airways may aggravate the situation of patients with CF, COPD and asthma [189–191].

3.1. Serine proteases and their inhibitors

Within the hierarchy of protease expressed in significant quantities in BAL and sputum from patients with chronic inflammatory lung diseases are primarily the neutrophil serine proteases (NSPs). Elevated active concentrations (ranging from 10^{-9} to 10^{-7} M) are found in the sputum of CF patients in comparison to healthy controls (see for a comprehensive review: [192]). The inflammatory process is characterized by a massive recruitment of neutrophils (also known as polymorphonuclear leukocytes, PMNs), representing up to 95% of the cell population, and which are the major source of NSPs in the human body. Active NSPs are stored and released by neutrophil primary (azurophilic) granules stimulated by cytokines and chemoattractants (i.e., IL8 and TNF- α), ultimately leading to the destruction of bacteria [193]. Among NSPs, HNE plays a key role in the control of infection and inflammation in lungs. HNE is a serine-protease related to chymotrypsin, which participates directly in the degradation of micro-organisms in the airways of CF and COPD patients, by cleavage of the outer membrane of protein F (OprF) [194–199]. Bacterial activity of HNE is effective against Gram-negative bacteria intracellularly but also extracellularly, once released by neutrophils. In these conditions, HNE may bind to negatively-charged DNA, forming the NETs [195,200]. In addition, HNE degrades a variety of extracellular matrix components (elastin, collagens I-IV, fibronectin, proteoglycans) and plasma proteins (plasminogen, fibrinogen, C3; C5 factors V, VII, XII and XIII) [201]. HNE cleaves immunoglobulins (IgA, IgG and IgM), activates chemokines, cytokines (IL-1, IL-2, IL-6, TNF- α), growth factors and cell surface receptors such as PAR-2 or TLR-4, and participates in mucus secretion (for review: [202]). Beside its ability to induce via a nuclear factor- κ B dependent manner the transcription of MMP-2 and cathepsin B (Cat B) [203], HNE also participates to the processing of a variety of zymogens, including proMMPs (proMMP-2, MMP-7 and MMP-9), members of ADAMs and meprin families, and procathepsin B. Moreover, HNE inactivates CFTR through a pathway involving the activation of intracellular calpains, and favoring *P. aeruginosa* lung infections in CF disease [204]. In addition, HNE degrades endogenous inhibitors of cysteine cathepsins (cystatin C) and MMPs (TIMPs) [205–207]. Inactivation of these broad-spectrum inhibitors is believed to be largely responsible for destruction of the alveolar matrix by dysregulating protease activity in emphysema. Other NSPs found in lung are Cat G, Pr3 and the recently discovered protease 4 (NSP-4) [208,209]. Despite the presence of other serine proteases such as mast cell tryptase in airways, their significance in chronic lung diseases is unclear [210]. NSPs have been shown to modulate surfactant activity by degrading surfactant proteins [211] (see the next chapter). To prevent harmful proteolytic activities, all NSPs are tightly controlled by their endogenous inhibitors, α_1 -antitrypsin (α_1 -AT), SLPI, and elafin (for review: [192]). Another pulmonary serine protease inhibitor is also found, called monocyte/neutrophil

elastase inhibitor (MNEI), which inhibits HNE, Cat G and Pr3 [212]. Nevertheless, a disrupted balance between human proteases and anti-proteases in favor of proteases is observed in CF, COPD and asthma patients. This imbalance has deleterious effects including up-regulated inflammation and tissue damage through degradation of the ECM and BM constituents. Smoking may cause a deregulation of the proteases-antiproteases balance in favor of proteases as illustrated by the increase of active HNE levels released in BALF of COPD patients, and by a deficiency of the activity of α_1 -AT (this last point remains controversial) [213–216]. Moreover, α_1 -AT can be either inactivated by Cat L [217], MMP-9 and MMP-12 [218,219] or by reactive oxygen species (ROS) from cigarette smoke and inflammatory cells [220]. Two critical residues, Met351 and Met358, which are present in the inhibitory site of α_1 -AT are sensitive to oxidation [221]. As previously mentioned, the levels of SLPI and elafin, two physiologically relevant HNE inhibitors, varied in the lungs of smokers or during infection. Similar to α_1 -AT, SLPI is inactivated by oxidative agents including cigarette smoke via the oxidation of methionine residues, particularly Met73 that is located in the reactive center of the binding loop [222,223]. The active loop of SLPI is also cleaved by Cat B, L and S, resulting in diminished anti-NSPs activity [224]. Recent studies reported the level of SLPI and elafin is decreased in CF *P. aeruginosa*-colonized patients, due to their proteolytic degradation by HNE [225,226]. For both inhibitors, cleavage occurs in the N-terminal domain, which is critical for the antibacterial activity. Recently, a new mechanism has been proposed claiming that the extensive degradation of SPLUNC1 by HNE may favor bacterial infections associated with COPD during acute exacerbations [227].

3.2. Matrix metalloproteases and their inhibitors

MMPs are a large family of at least 26 zinc-containing endopeptidases, which are involved in numerous physiological processes like embryological development, tissue remodeling and wound healing, by degrading major ECM components including elastins, collagens, gelatin, and proteoglycans but also non matrix proteins (for review: [228]). MMPs are expressed by a wide range of stromal cells (i.e. endothelial cells, mast cells, T-lymphocytes, fibroblasts, and epithelial cells), and also by neutrophils and alveolar macrophages, which both play central role in COPD, CF, asthma, lung cancer and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). The MMPs are classified into subgroups, on the basis of structure and specificity: collagenases (MMP-1 MMP-8, MMP-13 and MMP-18), gelatinases (MMP-2 and MMP-9), stromelysins (MMP-3, MMP-10, MMP-11 and MMP-27), and matrilysins (MMP-7 and MMP-26). Another subclass is represented by the membrane-type MMPs (MT-MMP-14 to MT-MMP-17, MT-MMP-24 and MT-MMP-25). Under normal physiological conditions, the activity of MMPs is strictly under the control of endogenous tissue inhibitors of metalloproteases (TIMPs), which are small proteins (TIMP-1, TIMP-2 and TIMP-3, ranging from 20 to 24 kDa) that bind to MMPs in a 1:1 stoichiometry. A large majority of MMP inhibition *in vivo* is also mediated by the non-specific inhibitor α_2 macroglobulin. Beside neutrophil serine proteases, the involvement of MMPs, primarily MMP-2, MMP-9 and MMP-12 (also known as macrophage elastase) in the pathophysiology of CF, COPD and asthma has been demonstrated, as shown in transgenic animal models studies and preliminary clinical studies in human (for review: [229–233]). Readers are directed elsewhere for a recent review on the potential roles of a disintegrin and metalloproteases (ADAMs) family in lung inflammation and in chronic lung diseases [234]. Concentrations of MMP-1, MMP-2, MMP-9 and MMP-12 levels are greater in sputum or BAL of patients with COPD and smokers when compared to healthy controls [235–238]. Cigarette smoke extract (and in particular acrolein) triggers the processing of

proMMP-9 into mature MMP-9, and stimulates its production via the activation of the EGF receptor/mitogen-activated protein kinase signaling pathway [239]. Contrary to MMP-7 and MMP-8, MMP-9 levels in sputum of smokers remain elevated even after 6 months smoking cessation, suggesting that at least MMP-9 in part contributes to the continuous lung disorders observed in COPD [240]. Studies on mice models with emphysema symptoms induced either by cigarette smoke extract or IL-13, reported an increased of the proteolytic activity of MMP-12, suggesting a role of MMP-12 in the pathogenesis of emphysema [241,242]. Polymorphisms of MMP-1, -2, -9 and -12 and TIMP-1 and TIMP-2 genes were associated with COPD [243,244], despite their role in COPD severity and symptoms has not been fully determined.

MMP-9 and MMP-12 are not only associated with COPD but also with asthma [245]. Elevated MMP-9, MMP-2 and MMP-8 levels were measured in the sputum, BALF and serum of asthmatics patients [246–249]. Moreover, cigarette exposure induces an over-expression of MMP-9 in airways of patients with asthma.

A plethora of studies support the involvement of MMPs in the pathogenesis of CF (for reviews: [229,250]). MMP-7, or matrilysin, plays a crucial role in host defense against bacteria and repair response in CF. Indeed, MMP-7 knockout mice are more sensitive to infections, likely due to a defective MMP-7 dependent-maturation of α - and β -defensins [251,252]. Moreover, MMP-7, which expression is increased ubiquitously in the airway of CF patients may be involved in the epithelium repair after injury [253]. Also both gelatinases MMP-2 and MMP-9 expression and activity are increased in BALF of CF patients, supporting an effective role in matrix repair [250,254]. Since MMPs are tightly regulated at the transcriptional, translational and post-translational levels, the mechanisms involved in the regeneration of lung tissue after proteolytic damage by MMPs are still unclear, but it is likely that repair events are similar to those during development (for review: [255]). Interestingly, MMP-12 is the only family member that demonstrates direct antimicrobial properties. The C-terminal domain of macrophage MMP-12, but not its catalytic domain, participates in the intracellular killing of both Gram-negative and Gram-positive bacteria in the lung [256]. TIMP-1 can be specifically inactivated by HNE (cleavage site: Val69–Cys70), leading to a 16 kDa fragment detected in sputum of CF patients [207,257–259].

3.3. Cysteine cathepsins and their inhibitors

Cysteine cathepsins are a class of eleven human lysosomal proteases (Cat B, C, F, H, K, L, O, S, V, and X/Z) belonging to the C1 papain family that play important roles in proteolysis of a wide variety of substrates during physiological processes including maturation of MHC class II complex, bone remodeling, and keratinocyte differentiation, which have been covered by recent comprehensive reviews [260,261]. Noteworthy, the name of cathepsin was also introduced for cathepsins D and E, which are aspartic proteases and cathepsins A and G, two serine proteases. The classification of cathepsins family as well as other classes of proteases and their inhibitors can be found in the MEROPS database (<http://merops.sanger.ac.uk>) [262]. Cysteine cathepsins are localized in acidic compartments (i.e. lysosomes and endosomes) and degrade intracellular or endocytosed proteins as scavengers, but also are involved in the proteolytic processing of specific substrates. In general, most cathepsins are optimally active in acidic environments and are rapidly and irreversibly inactivated at neutral pH, except for Cat S that remains stable and active at pH 7.4. Important and specific roles have been associated with cysteine cathepsins activity outside lysosomes (secretory vesicles, cytosol, mitochondria, nucleus, extracellular medium) [263–267]. The majority of cysteine cathepsins (i.e. Cat B, C, H, L, X and V) are ubiquitously

expressed in human tissues, while Cat K, S and W expression is restricted to specific cell or tissue [268]. Moreover, similar to NSPs and MMPs, ectopic or excessive expression and activity of cysteine cathepsins contribute to a number of diseases, such as cancer, osteoporosis, atherosclerosis, arthritis, cardiovascular diseases, emphysema, and neurodegenerative diseases [12,269]. Cat B, L, K and S are able to cleave several key ECM and BM constituents, including collagens, fibronectin, nidogens, proteoglycans and laminins, and thus are important contributors in tumor invasion and metastasis. Moreover, specific cysteine cathepsins (Cat K, S, and V) present higher collagenolytic and elastolytic activities compared to HNE or MMP collagenases, suggesting their involvement in the remodeling of ECM that occurs in various pathologies. Patterns of cysteine cathepsins expression in normal lung is roughly distributed in most of tissues and cells [270]. The two prevalent endopeptidase cathepsins, Cat B and L, are primarily found in bronchial epithelial cells, which contribute to the first line of defense against environment. The aminopeptidase Cat H is retrieved in significant amounts mostly in macrophages, bronchial epithelial cells and type II pneumocytes. Cat C is present in type II alveolar epithelial cells [271] while Cat X and S are expressed mainly in macrophages. Cat S is present also on the surface of ciliated cells and may favor the motility of cilia by preventing unspecific binding with circulating plasma-derived proteins [272]. Finally, Cat K is located in bronchial and alveolar epithelial cells and macrophages [273,274].

To prevent any uncontrolled proteolytic activity, cysteine cathepsins are tightly regulated by their major endogenous protein inhibitors, the cystatins (family I25, clan IH) (for review [275]). Other protein inhibitors of cysteine proteases, thyroptins (i.e. p41 invariant chain, equistatin, thyroglobulin type-1 domain) and serpins (i.e. squamous cell carcinoma antigen-1, hurpin) among others, are well detailed in the following review [261]. Briefly, the cystatin family is divided into three main groups. Type 1 regroups stefins A and B (~100 amino acids, 11 kDa), which are mostly localized intracellular, type 2 contains among other cystatin C (~120 amino acid, 13 kDa), which is present extracellularly and type 3 comprises the kininogens that are found at high concentrations in blood, plasma, urine, sperm or lungs (for review: [276]). Two kininogens are present in humans: high molecular weight kininogen, HMWK (90–120 kDa) and low molecular weight kininogen, LMWK (50–70 kDa) [277]. Moreover, the proteolytic activity of cysteine cathepsins is controlled by their propeptide, pH, ionic strength and glycosaminoglycans (for further readings see Ref. [261]). A novel mode of regulation has been recently proposed that uses a «cannibalism» mechanism between cysteine cathepsins, in particular Cat S may cleave and inactivate Cat K, leading to a decrease of its collagenolytic or elastolytic property [278].

Litterature provides ample evidence that cysteine cathepsins also contribute to lung diseases, such as fibrosis, emphysema, bronchial asthma and CF [270,275,279–282]. Similar to HNE and MMPs, there is an imbalance between cysteine cathepsins and cystatins in COPD. Alveolar macrophage Cat B-like activity was found higher in BALF from COPD smokers than non smokers [283]. As seen previously, HNE contributes likely to the maturation of Cat B by processing the pro-enzyme [205] and this may be further amplified since Cat B can inactivate SLPI [224]. Cat B has been recently suggested as a plausible “downstream biomarker” of local HNE in COPD [284]. In addition, truncated cystatin C was detected in sputum, which correspond to a similar form generated by HNE *in vitro*, and which inhibition property toward Cat B was impaired compared with native cystatin C [285]. Another abundant cysteine cathepsin, Cat L was found in BALFs of smokers with emphysema compared with non-smokers and smokers without emphysema [286]. Despite that Cat L cleaves *in vitro* α_1 -AT, favoring uncontrolled proteolytic activity its biological role in COPD remains to be

defined [217]. The potent collagenolytic and elastinolytic Cat K, which is expressed in bronchial and alveolar epithelial cells may participate with other proteases in the degradation of lung parenchyma in COPD [274]. In a guinea pig model of emphysema, Cat K activity is increased, associated to a significant decrease of collagens and elastins in the alveolar wall [287]. Similar observations were reported in the lungs of patients with emphysema. Overexpression and secretion of Cat B, H, L, K and S, and MMP-12 has been observed in mouse models of IL-13 and IFN- γ -stimulated COPD disease [288,289]. In addition, inhibition of these enzymes with synthetic inhibitors was found to reduce significantly the severity of emphysema and inflammation, suggesting that cathepsins with MMPs play an important role in COPD. Similar to Cat K, Cat S likely participates in lung destruction and emphysema through the proteolysis of crucial ECM and BM constituents as well as SLPI, leading to elevated levels of HNE. Interestingly, incubation of macrophages with BALFs from patients with COPD induced high level of Cat S, which was blocked by IFN- γ -neutralizing antibodies [290]. Nonetheless, SLPI blocked IFN- γ -induced Cat S expression, suggesting a complex interplay between Cat S and other factors in the lung of COPD patients [291]. Cigarette smoke extract up-regulates the expression of Cat B and S in lung macrophages, mediated by IL-18, for COPD smokers [292]. Moreover, Cat S levels are increased in BALF from mice exposed to ozone while its inhibition reduces airway hyper-responsiveness and neutrophil recruitment, which could represent a promising alternative in the treatment of oxidative stress-induced inflammation therapeutic [293]. Several studies reported that immunoreactive cystatin C that is significantly increased in BALF and serum of COPD smokers patients could be a potential biomarker of COPD severity [286,294,295].

McElvaney and colleagues reported the increase (~several 100-fold) of proteolytically active Cat B, Cat L and Cat S in BALFs of CF patients compared with non CF volunteers [296]. It was proposed that Cat B and Cat S expression are suitable markers of CF airway inflammation, like HNE and IL-8 [297]. But conversely to HNE, active Cat B, H, K, L and S levels remain unchanged in *P. aeruginosa*-positive and *P. aeruginosa*-negative CF sputa, suggesting that cysteine cathepsins are not biomarkers of bacterial infection in lungs of CF patients [298]. Higher concentration of active Cat S is found in *P. aeruginosa*-negative BALFs of CF children compared with non-CF children with recurrent lung infection, suggesting that up-regulation of Cat S is specific to CF [299]. Authors demonstrated that miR-31, a major miRNA highly expressed in non-CF primary epithelial cells and which regulates the transcription of interferon regulatory factor 1 (IRF-1), is downregulated in CF, leading to an elevated production of Cat S in CF airways. Restoring miR-31 expression in CF epithelial cells reduces expression of Cat S, suggesting that miR-31-mediated pathway could be an alternative direction for therapies against chronic inflammatory lung diseases. McElvaney group and our laboratory identified different AMPs (LL-37, SP-A, lactoferrin, HBD-2 and -3) as potent substrates of Cat B, L and S, leading to the loss of their antimicrobial activity toward Gram-negative and Gram-positive bacteria [224,296,300–302]. Cat S, a contributor in major histocompatibility complex (MHC) class II maturation and antigen presentation, is the most potent cysteine cathepsin to cleave all the AMPs mentioned (see the following section), supporting a regulatory role in lung innate immunity. Moreover, Cat H, which is expressed in type II pneumocytes is involved in the processing of pulmonary prosurfactant C (proSP-C) as well as in SP-B production, and was proposed to have a beneficial role in mice pulmonary homeostasis [303,304]. Cystatin C and kininogens are found in CF sputum [298]. Kininogens were extensively degraded, which may be correlated with the inability of kininogens to inhibit Cat B (Ki in the micromolar range) and their

extensive susceptibility to cleavage by Cat B [305]. The overall imbalance between cysteine cathepsins and related inhibitors in CF may favor the harmful proteolytic activities of this class of protease in lungs. Interestingly, despite the presence of ROS in CF lungs and the partially defective antioxidant defense, cysteine cathepsins may retain partially their activity in an oxidative environment [306–308].

The contribution of cysteine cathepsins in asthma has been less explored. Only Cat S, which expression is correlated with asthma pathogenesis, was proposed to serve as a biomarker for monitoring the extent of the disease and response to therapy [309,310]. Mouse model of induced allergic inflammation expressed high levels of Cat S [293], while inhibition of Cat S with a selective pharmacological inhibitor blocked the infiltration of pulmonary eosinophils [311]. In addition, genetic and pharmacological studies strongly support the involvement of Cat S in the development of the allergic response [312]. Pharmaceutical companies have developed several Cat S inhibitors, which some are promising therapies for autoimmune diseases. Selective and reversible Cat S inhibitors used in preclinical trials for treating bronchial asthma are apparently discontinued in favor of other diseases such as osteoarthritis and peripheral neuropathic pain [313]. Beside Cat S, Cat K and F may participate to the pathogenesis of asthma and their exact role remains to be determined [314,315].

In other inflammatory lung diseases, elevated levels of active Cat B, H, K, L and S are found in the BALF of patients with silicosis or sarcoidosis [316,317]. Cat B and L are the most abundant cysteine endopeptidases present and the balance between cysteine cathepsins and cystatins was dysregulated in favor to proteases with an overall concentration ~10 times higher in acute inflammatory lung diseases compared to that found in BALFs of silicotic patients [318].

4. An ambiguous companionship between AMPs and human proteases

In healthy lung, innate immunity is controlled and modulated at least in part by protease production and action. Nevertheless, under inflammatory conditions the integrity of innate immunity in airways is impaired by endogenous proteases, in addition to proteases secreted by pathogens. Despite the fact that AMPs are somewhat resistant to proteolytic degradation, some human proteases cleave them efficiently, impairing their antimicrobial potency. Contrastingly, and by a kind of balancing effect, some AMPs have an additional function of antiproteases.

4.1. Susceptibility of AMPs to proteolytic degradation

4.1.1. Collectins SP-A and SP-D

Beside bacterial proteases (i.e. elastase and protease IV from *P. aeruginosa* and staphopain from *S. aureus*) and thiol-dependent proteases from mite allergens (i.e. Derp1 from *Dermatophagoides pteronyssinus* 1 and Derf1 from *Dermatophagoides farinae*), host NSPs may also inactivate lung SP-A and SP-D [211,319–322]. SP-D cleavage occurs within the conserved subregion of its C-terminal carbohydrate recognition domain (CRD) close to the Ca²⁺ binding site, generating a N-terminal fragment (~35 kDa) lacking its lectin-like capability [323]. Likewise, the alveolar macrophage MMP-9 inactivates SP-D, but contrary to HNE, its truncated SP-D fragments retain CRD-dependent binding to *E. coli* LPS [324]. Cat S cleaves also SP-A within residues of the solvent exposed loop of its C-type lectin domain, resulting in a decrease of its aggregation and agglutination properties against *P. aeruginosa* [301] (Fig. 1). Interestingly, truncated SP-A and SP-D fragments could be active effectors mediating either pro- or anti-inflammatory response, as

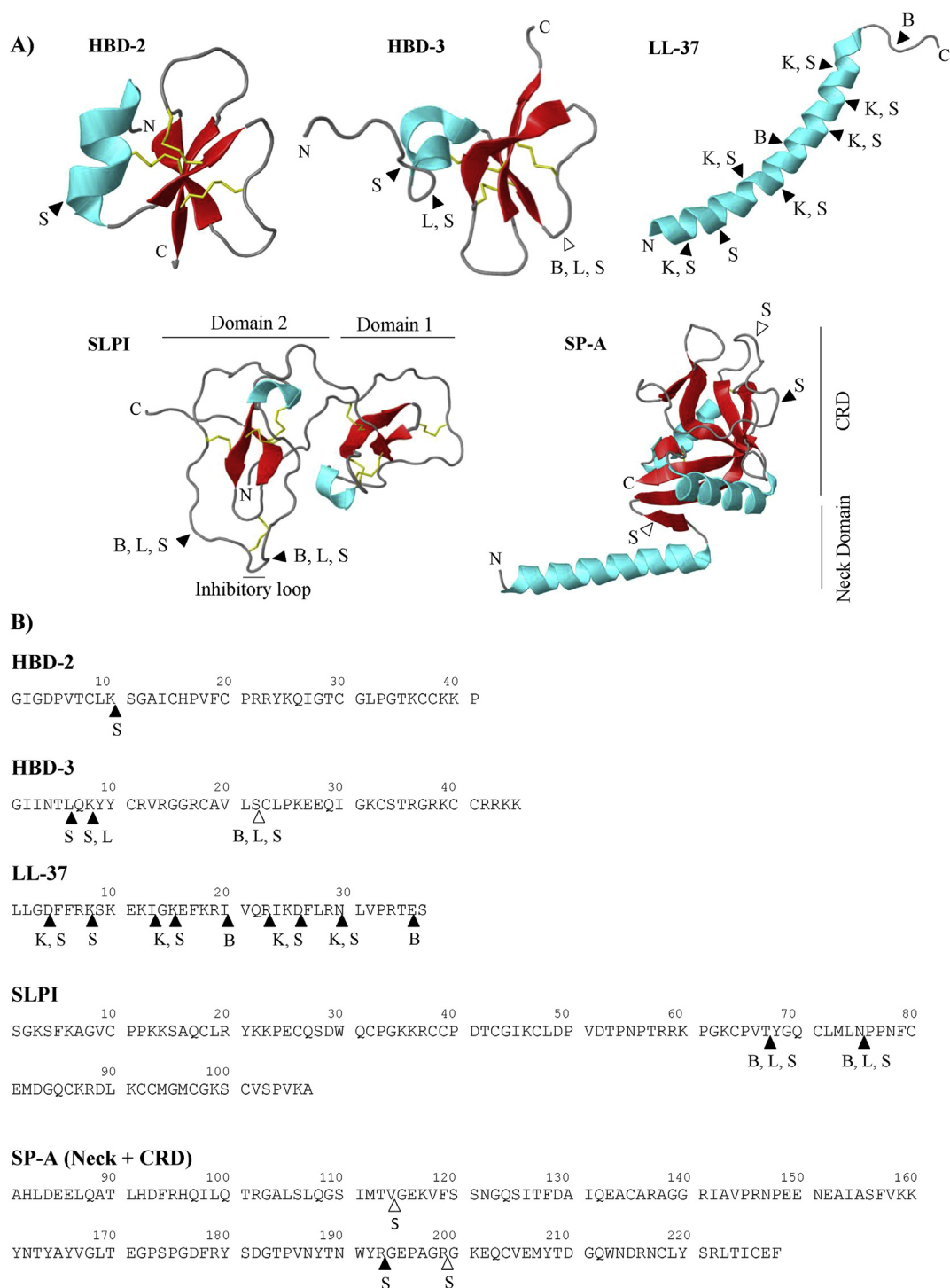


Fig. 1. Identified AMPs cleavage sites of Cat B, K, L and S. A) 3-D structure (ribbon representation) of defensins HBD-2 (pdb 1FD3) and HBD-3 (pdb 1KJ6), LL-37 (pdb 1K60), and SP-A (pdb 3PBF). SLPI structure was provided by Thierry Moreau (Tours, France). Atomic coordinates were obtained from the SLPI-chymotrypsin complex (Wolfram Bode, Munich, Germany). Disulfide bonds are depicted in yellow. The major and minor cleavage sites are indicated by a black and white triangle, respectively. B) Amino acids sequence of AMPs and location of Cat B, K, L and S cleavage sites.

reported in CF BALF [325,326]. Moreover, Ca^{2+} can block *in vitro* the degradation of collectins in a dose-dependent manner. This depends probably on conformational changes of protein surfactant preventing accessibility of the globular C-terminal domain to proteases [327].

4.1.2. LL-37/hCAP-18

Generation of the cationic α -helical peptide LL-37 is mediated by NSPs, in particular Pr3 [90,328]. Proteases of significant host pathogens, including aureolysin and V8 protease, two major proteases produced by *S. aureus*, as well as elastase of *P. aeruginosa* and karilysin, a MMP-like enzyme from the Gram-negative *Tannerella forsythia* bacteria, were shown to degrade LL-37 [329–331].

Proteolytic inactivation of LL-37 result in truncated peptides with altered antimicrobial activity and reduced immunomodulatory function. Beside bacterial proteases, some host proteases, among them HNE and Cat D, participate in the cleavage of unbound LL-37 in CF lungs [98]. Recently, alveolar macrophage Cat S and K and to a less extent Cat B were identified as new players in LL-37 proteolysis (Fig. 1), the proteolytic inactivation being impaired in the presence of sulfated GAGs [302]. Kallikreins 5 (stratum corneum tryptic enzyme, SCTE) and 7 (stratum corneum chymotryptic protease, SCCE) have been reported to control the processing of hCAP-18, and also to hydrolyze LL-37 into fragments with alternate biological activity in skin [332]. Surprisingly, both kallikreins do not interfere with LL-37 in lung despite an high level of expression in pulmonary tissues [333,334], suggesting that organ-specific molecular mechanisms/regulations may occur. According to LL-37, which is expressed in tissues either constitutively or overproduced during inflammation may be cytotoxic at elevated concentration [335], one could hypothesize the benefit of hydrolysis-dependent regulation by host proteases.

4.1.3. Lactoferrin, lysozyme, HBD-2 and -3, and SLPI

McElvaney, Taggart and colleagues have contributed largely to a better understanding of host proteases-mediated AMPs degradation in CF patients. In particular, Cat B, L and S participate in the cleavage of lactoferrin and HBD-2 and -3 in CF BALF (Fig. 1) [296,300]. Furthermore, all three proteases are able to degrade SLPI in emphysema [224]. This cleavage results in a loss of HNE inhibition, supporting that cathepsins not only may restrain host innate immunity defense but also participate in lung destruction in inflammatory lung diseases by enhancing uncontrolled protease activity. Apparently, none of human NSPs and MMPs degrade these AMPs, at the noticeable exception of HNE that cleaves at high concentration SLPI (enzyme: inhibitor molar ratio, 2:1) into an ~8–10 kDa forms, which is consistent with the presence of truncated SLPI in BAL of *P. aeruginosa*-colonized CF patients [50,225,336].

4.2. The Janus face of AMPs: inhibitors of proteases

Vertebrate AMPs are involved in a variety of extra functions (e.g. inflammation, immune activation, and lung injury and wound repair [7,337–339]) besides their antimicrobial function. Moreover, some of these AMPs have been described as potent human protease inhibitors (Table 3). Serine proteases, including HNE, Pr3, and Cat G are inhibited by SLPI, elafin and trappin-2, three members of the chelonianin family (for review: [340]). The high affinity of these inhibitors for NSPs (Ki in the picomolar range) and their elevated concentration in bronchiolar epithelial cells (~10 µg/ml) [224,341,342] strengthen their prominent role in the control of HNE-mediated proteolysis in the upper airways of CF patients [134]. In addition, the broad antimicrobial activity of SLPI, elafin

and trappin-2 does not rely on the antiprotease activity, which is related to the C-terminal WAP domain as demonstrated by *in vitro* studies on Gram-negative and Gram-positive bacteria using recombinant isolated N-terminal trappin-2 (cementoin) and C-terminal (elafin) domains [72,343,344]. Despite histatin 5 is exclusively expressed in human salivary secretions [119], it is noteworthy to indicate that histatin 5 is a potent inhibitor of host enzymes MMP-2 and MMP-9 and two bacterial cysteine proteases (Arg- and Lys-gingipains) of *Porphyromonas gingivalis* [345]. Most probably, histatin 5, which exhibits a Zn²⁺-binding motif HEXXH, inactivates MMP-2 and MMP-9 by chelating the zinc ion that is essential for the enzymatic activity of MMP [346].

The N-terminal prodomain of hCAP-18 was also called cathelin domain (CLD) because it shares a common structural fold with chicken cistatin, and was proposed to inhibit the peptidase activity of Cat L [101]. However, the three functional segments of cistatins that constitutes the inhibitory site and are responsible for the inhibition of cysteine cathepsins, are lacking in human CLD [347]. Truly, CLD did not inhibit Cat L whereas Cat L peptidase activity was impaired in the presence of LL-37 or hCAP-18 in a dose dependent manner [348]. Authors suggested that LL-37 but not CLD is likely the inhibitory domain. Very recently, we confirmed that LL-37 is a substrate of Cat S and K and demonstrated that LL-37 competitively inhibits Cat L (Ki = 150 nM) [302]. LL-37 may bind to the active site of Cat L in both forward (i.e., substrate like) and reverse orientations with similar binding energies, as suggested by molecular modeling studies [302]. However, the impact of the anti-protease function of LL-37 on the pathogenesis of lung inflammatory diseases including CF, COPD and asthma is still speculative and further research is needed.

5. Concluding remarks

In order to battle daily microbial infections, the lung is endowed with potent and diverse sentinels and anti-inflammatory proteins. However, during CF, COPD and asthma, the balance between host proteases and their secreted endogenous inhibitors is overwhelmed in favor to proteolysis, compromising the antimicrobial barrier. Beyond their major role in the degradation of ECM and BM components and the activation and regulation of cellular activity related to these chronic lung diseases, increasingly numerous evidences support that human proteases (NSPs, MMPs and cysteine cathepsins) in concert with bacterial proteases play crucial roles in pathophysiological episodes, by degrading and inactivating major AMPs. Therefore, therapeutics that could restore locally the lung protease/antiprotease imbalance by favoring either the down-expression of specific host proteases or maintaining a safe level of endogenous inhibitors in the lung may be worthy to preserve innate immunity integrity and function and to control excessive inflammatory responses.

Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest.

Acknowledgments

We apologize for any references omitted due to space limitations. We acknowledge the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) for institutional funding. P.M.A. holds a doctoral fellowship from INSERM and the Région Centre-Val de Loire, France.

Table 3
Inhibition of human proteases by AMPs.

AMP	Target protease	Protease family	Ki (nM)	IC-50 (nM)	Ref.
SLPI	HNE	serine	0.01–1.90	—	[340]
	Pr3		1000	—	
	Cat G		4.2–10.0	—	
Trappin-2	HNE	serine	0.03–0.10	—	—
	Pr3		0.18–0.36	—	
Elafin	HNE	serine	0.08–0.17	—	—
	Pr3		0.12–9.50	—	
Histatin 5	MMP-2	metallo	—	570	[345]
	MMP-9		—	250	
LL-37	Cat L	cysteine	150	—	[302]

References

- [1] B. Lighthart, Mini-review of the concentration variations found in the alfresco atmospheric bacterial populations, *Aerobiologia* 16 (2000) 7–16.
- [2] J.A. Whitsett, T. Alenghat, Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity, *Nat. Immunol.* 16 (2015) 27–35.
- [3] T.R. Martin, C.W. Frevert, Innate immunity in the lungs, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2 (2005) 403–411.
- [4] D. Parker, A. Prince, Type I interferon response to extracellular bacteria in the airway epithelium, *Trends Immunol.* 32 (2011) 582–588.
- [5] J.L. Werner, C. Steele, Innate receptors and cellular defense against pulmonary infections, *J. Immunol.* 193 (2014) 3842–3850.
- [6] P.S. Hiemstra, Defensins and cathelicidins in inflammatory lung disease: beyond antimicrobial activity, *Biochem. Soc. Trans.* 34 (2006) 276–278.
- [7] G. Diamond, N. Beckloff, A. Weinberg, K.O. Kisich, The roles of antimicrobial peptides in innate host defense, *Curr. Pharm. Des.* 15 (2009) 2377–2392.
- [8] J. Wiesner, A. Vilcinskas, Antimicrobial peptides: the ancient arm of the human immune system, *Virulence* 1 (2010) 440–464.
- [9] J. Potempa, R.N. Pike, Corruption of innate immunity by bacterial proteases, *J. Innate Immun.* 1 (2009) 70–87.
- [10] L.M. Crosby, C.M. Waters, Epithelial repair mechanisms in the lung, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 298 (2010) L715–L731.
- [11] C.M. Yamashita, D.C. Radisky, Y. Aschner, G.P. Downey, The importance of matrix metalloproteinase-3 in respiratory disorders, *Expert Rev. Respir. Med.* 8 (2014) 411–421.
- [12] M. Fonović, B. Turk, Cysteine cathepsins and extracellular matrix degradation, *Biochim. Biophys. Acta* 1840 (2014) 2560–2570.
- [13] R. Bals, Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection, *Respir. Res.* 1 (2000) 141–150.
- [14] K.A. Brogden, Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat. Rev. Micro* 3 (2005) 238–250.
- [15] V. Kaiser, G. Diamond, Expression of mammalian defensin genes, *J. Leukoc. Biol.* 68 (2000) 779–784.
- [16] M. Zasloff, Antimicrobial peptides of multicellular organisms, *Nature* 415 (2002) 389–395.
- [17] H. Jenssen, P. Hamill, R.E.W. Hancock, Peptide antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.* 19 (2006) 491–511.
- [18] M. Rogan, P. Geraghty, C. Greene, S. O'Neill, C. Taggart, N. McElvaney, Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence, *Respir. Res.* 7 (2006) 29.
- [19] S.H. Sim, Y. Liu, D. Wang, V. Novem, S.P. Sivalingam, T.W. Thong, E.E. Ooi, G. Tan, Innate immune responses of pulmonary epithelial cells to Burkholderia pseudomallei infection, *PLoS One* 4 (2009) e7308.
- [20] A.T. Nathan, E.A. Peterson, J. Chakir, M. Wills-Karp, Innate immune responses of airway epithelium to house dust mite are mediated through beta-glucan-dependent pathways, *J. Allergy Clin. Immunol.* 123 (2009) 612–618.
- [21] M.R. Yeaman, N.Y. Yount, Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance, *Pharmacol. Rev.* 55 (2003) 27–55.
- [22] Y. Lai, R.L. Gallo, AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense, *Trends Immunol.* 30 (2009) 131–141.
- [23] B. Schitteck, R. Hipfel, B. Sauer, J. Bauer, H. Kalbacher, S. Stevanovic, M. Schirle, K. Schroeder, N. Blin, F. Meier, G. Rassner, C. Garbe, Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands, *Nat. Immunol.* 2 (2001) 1133–1137.
- [24] H.G. Boman, Antibacterial peptides: basic facts and emerging concepts, *J. Intern. Med.* 254 (2003) 197–215.
- [25] E. Andrès, J.-L. Dimarcq, Peptides antimicrobiens cationiques: de l'étude de l'immunité innée à la production de médicaments, *Mise à jour, Médecine Mal. Infect.* 37 (2007) 194–199.
- [26] W. Bellamy, M. Takase, H. Wakabayashi, K. Kawase, M. Tomita, Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin, *J. Appl. Bacteriol.* 73 (1992) 472–479.
- [27] P. Mak, K. Wójcik, L. Wicherek, P. Suder, A. Dubin, Antibacterial hemoglobin peptides in human menstrual blood, *Peptides* 25 (2004) 1839–1847.
- [28] T. Tecle, S. Tripathi, K.L. Hartshorn, Review: defensins and cathelicidins in lung immunity, *Innate Immun.* 16 (2010) 151–159.
- [29] T.D. Brogan, H.C. Ryley, L. Neale, J. Yassa, Soluble proteins of broncho-pulmonary secretions from patients with cystic fibrosis, asthma, and bronchitis, *Thorax* 30 (1975) 72–79.
- [30] O. Harbitz, A.O. Jenssen, O. Smidsrød, Lysozyme and lactoferrin in sputum from patients with chronic obstructive lung disease, *Eur. J. Respir. Dis.* 65 (1984) 512–520.
- [31] R.F. Dubin, S.K. Robinson, J.H. Widdicombe, Secretion of lactoferrin and lysozyme by cultures of human airway epithelium, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 286 (2004) L750–L755.
- [32] T. Ganz, Antimicrobial polypeptides, *J. Leukoc. Biol.* 75 (2004) 34–38.
- [33] H.T. Akinbi, R. Epaud, H. Bhatt, T.E. Weaver, Bacterial killing is enhanced by expression of lysozyme in the lungs of transgenic mice, *J. Immunol.* 165 (2000) 5760–5766.
- [34] R. Dajani, Y. Zhang, P.J. Taft, S.M. Travis, T.D. Starner, A. Olsen, J. Zabner, M.J. Welsh, J.F. Engelhardt, Lysozyme secretion by submucosal glands protects the airway from bacterial infection, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 32 (2005) 548–552.
- [35] A. Fleming, On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions, *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 93 (1922) 306–317.
- [36] N.J. Laible, G.R. Germaine, Bactericidal activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides, *Infect. Immun.* 48 (1985) 720–728.
- [37] L.N. Johnson, D.C. Phillips, Structure of some crystalline lysozyme-inhibitor complexes determined by X-ray analysis at 6 Å resolution, *Nature* 206 (1965) 761–763.
- [38] V.A. Proctor, F.E. Cunningham, The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 26 (1988) 359–395.
- [39] E.N. Baker, H.M. Baker, Molecular structure, binding properties and dynamics of lactoferrin, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 62 (2005) 2531–2539.
- [40] J. He, P. Furmanski, Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA, *Nature* 373 (1995) 721–724.
- [41] D.M. Mann, E. Romm, M. Migliorini, Delineation of the glycosaminoglycan-binding site in the human inflammatory response protein lactoferrin, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 23661–23667.
- [42] P.H. van Berkel, M.E. Geerts, H.A. van Veen, M. Mericskay, H.A. de Boer, J.H. Nuijens, N-terminal stretch Arg2, Arg3, Arg4 and Arg5 of human lactoferrin is essential for binding to heparin, bacterial lipopolysaccharide, human lysozyme and DNA, *Biochem. J.* 328 (Pt 1) (1997) 145–151.
- [43] E.C. Leitch, M.D. Willcox, Elucidation of the antistaphylococcal action of lactoferrin and lysozyme, *J. Med. Microbiol.* 48 (1999) 867–871.
- [44] S.A. González-Chávez, S. Arévalo-Gallegos, Q. Rascón-Cruz, Lactoferrin: structure, function and applications, *Int. J. Antimicrob. Agents* 33 (2009), 301.e1–8.
- [45] H. Jenssen, R.E.W. Hancock, Antimicrobial properties of lactoferrin, *Biochimie* 91 (2009) 19–29.
- [46] J. Breton-Gorius, D.Y. Mason, D. Buriot, J.L. Vilde, C. Griscelli, Lactoferrin deficiency as a consequence of a lack of specific granules in neutrophils from a patient with recurrent infections. Detection by immunoperoxidase staining for lactoferrin and cytochemical electron microscopy, *Am. J. Pathol.* 99 (1980) 413–428.
- [47] K.J. Lomax, J.I. Gallin, D. Rotrosen, G.D. Raphael, M.A. Kaliner, E.J. Benz, L.A. Boxer, H.L. Malech, Selective defect in myeloid cell lactoferrin gene expression in neutrophil specific granule deficiency, *J. Clin. Invest* 83 (1989) 514–519.
- [48] S. Weldon, C.C. Taggart, Innate host defense functions of secretory leukoprotease inhibitor, *Exp. Lung Res.* 33 (2007) 485–491.
- [49] I. Kouchi, S. Yasuoka, Y. Ueda, T. Ogura, Analysis of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in bronchial secretions from patients with hypersecretory respiratory diseases, *Tokushima J. Exp. Med.* 40 (1993) 95–107.
- [50] C. Vogelmeier, R.C. Hubbard, G.A. Fells, H.P. Schneck, R.C. Thompson, H. Fritz, R.G. Crystal, Anti-neutrophil elastase defense of the normal human respiratory epithelial surface provided by the secretory leukoprotease inhibitor, *J. Clin. Invest* 87 (1991) 482–488.
- [51] C.H. Lee, Y. Igarashi, R.J. Hohmann, H. Kaulbach, M.V. White, M.A. Kaliner, Distribution of secretory leukoprotease inhibitor in the human nasal airway, *Am. Rev. Respir. Dis.* 147 (1993) 710–716.
- [52] P.S. Hiemstra, Novel roles of protease inhibitors in infection and inflammation, *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2002) 116–120.
- [53] A. Scott, S. Weldon, C.C. Taggart, SLPI and elafin: multifunctional anti-proteases of the WFDC family, *Biochem. Soc. Trans.* 39 (2011) 1437–1440.
- [54] U. Seemüller, M. Arnhold, H. Fritz, K. Wiedenmann, W. Machleidt, R. Heinzel, H. Appelhans, H.G. Gassen, F. Lottspeich, The acid-stable proteinase inhibitor of human mucous secretions (HUSI-I, antileukoprotease). Complete amino acid sequence as revealed by protein and cDNA sequencing and structural homology to whey proteins and Red Sea turtle proteinase inhibitor, *FEBS Lett.* 199 (1986) 43–48.
- [55] S. Ranganathan, K.J. Simpson, D.C. Shaw, K.R. Nicholas, The whey acidic protein family: a new signature motif and three-dimensional structure by comparative modeling, *J. Mol. Graph. Model* 17 (1999) 106–113, 134–136.
- [56] J. Melrose, P. Ghosh, T.K. Taylor, J.L. Andrews, The serine proteinase inhibitory proteins of the human intervertebral disc: their isolation, characterization and variation with ageing and degeneration, *Matrix* 12 (1992) 456–470.
- [57] F. Gauthier, U. Fryksmark, K. Ohlsson, J.G. Bieth, Kinetics of the inhibition of leukocyte elastase by the bronchial inhibitor, *Biochim. Biophys. Acta* 700 (1982) 178–183.
- [58] C. Boudier, J.G. Bieth, The proteinase: mucus proteinase inhibitor binding stoichiometry, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 4370–4375.
- [59] S. Doumas, A. Kolokotronis, P. Stefanopoulos, Anti-inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor, *Infect. Immun.* 73 (2005) 1271–1274.
- [60] P.S. Hiemstra, R.J. Maassen, J. Stolk, R. Heinzel-Wieland, G.J. Steffens, J.H. Dijkman, Antibacterial activity of antileukoprotease, *Infect. Immun.* 64 (1996) 4520–4524.
- [61] J.F. Tomee, P.S. Hiemstra, R. Heinzel-Wieland, H.F. Kauffman, Antileukoprotease: an endogenous protein in the innate mucosal defense against fungi, *J. Infect. Dis.* 176 (1997) 740–747.
- [62] O. Wiedow, J. Harder, J. Bartels, V. Streit, E. Christophers, Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248 (1998) 904–909.
- [63] S.M. Wahl, T.B. McNeely, E.N. Janoff, D. Shugars, P. Worley, C. Tucker,

- J.M. Orenstein, Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in mucosal fluids inhibits HIV-I, *Oral Dis.* 3 (Suppl. 1) (1997) S64–S69.
- [64] G. Ma, T. Greenwell-Wild, K. Lei, W. Jin, J. Swisher, N. Hardegen, C.T. Wild, S.M. Wahl, Secretory leukocyte protease inhibitor binds to annexin II, a cofactor for macrophage HIV-1 infection, *J. Exp. Med.* 200 (2004) 1337–1346.
- [65] M.C.A. da Silva, J.-M. Zahm, D. Gras, O. Bajolet, M. Abely, J. Hinnrasky, M. Milliot, M.C. de Assis, C. Hologne, N. Bonnet, M. Merten, M.C. Plotkowski, E. Puchelle, Dynamic interaction between airway epithelial cells and *Staphylococcus aureus*, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 287 (2004) L543–L551.
- [66] J.M. Sallenave, J. Schulmann, J. Crossley, M. Jordana, J. Gauldie, Regulation of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) and elastase-specific inhibitor (ESI/elafin) in human airway epithelial cells by cytokines and neutrophilic enzymes, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 11 (1994) 733–741.
- [67] J.M. Sallenave, M.D. Marsden, A.P. Ryle, Isolation of elafin and elastase-specific inhibitor (ESI) from bronchial secretions. Evidence of sequence homology and immunological cross-reactivity, *Biol. Chem. Hoppe. Seyler* 373 (1992) 27–33.
- [68] K. Nara, S. Ito, T. Ito, Y. Suzuki, M.A. Ghoneim, S. Tachibana, S. Hirose, Elastase inhibitor elafin is a new type of proteinase inhibitor which has a transglutaminase-mediated anchoring sequence termed "cementoin", *J. Biochem. (Tokyo)* 115 (1994) 441–448.
- [69] J. Schalkwijk, O. Wiedow, S. Hirose, The trappin gene family: proteins defined by an N-terminal transglutaminase substrate domain and a C-terminal four-disulphide core, *Biochem. J.* 340 (Pt 3) (1999) 569–577.
- [70] K. Hochstrasser, G.J. Albrecht, O.L. Schönberger, B. Rasche, K. Lempart, An elastase-specific inhibitor from human bronchial mucus. Isolation and characterization, *Hoppe-Seyler's Z. Für Physiol. Chem.* 362 (1981) 1369–1375.
- [71] O. Wiedow, J. Lüdemann, B. Utecht, Elafin is a potent inhibitor of proteinase 3, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174 (1991) 6–10.
- [72] K. Baranger, M.-L. Zani, J. Chandenier, S. Dallet-Choisly, T. Moreau, The anti-bacterial and antifungal properties of trappin-2 (pre-elafin) do not depend on its protease inhibitory function, *FEBS J.* 275 (2008) 2008–2020.
- [73] T. Ganz, Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003) 710–720.
- [74] N.Y. Yount, M.R. Yeaman, Multidimensional signatures in antimicrobial peptides, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101 (2004) 7363–7368.
- [75] T. Ganz, M.E. Selsted, D. Szklarek, S.S. Harwig, K. Daher, D.F. Bainton, R.L. Lehrer, Defensins, Natural peptide antibiotics of human neutrophils, *J. Clin. Invest.* 76 (1985) 1427–1435.
- [76] T. Ganz, M.E. Selsted, R.L. Lehrer, Defensins, *Eur. J. Haematol.* 44 (1990) 1–8.
- [77] S.S. Harwig, T. Ganz, R.L. Lehrer, Neutrophil defensins: purification, characterization, and antimicrobial testing, *Methods Enzymol.* 236 (1994) 160–172.
- [78] M.E. Selsted, A.J. Ouellette, Mammalian defensins in the antimicrobial immune response, *Nat. Immunol.* 6 (2005) 551–557.
- [79] M. Frye, J. Bargon, N. Dauletbaev, A. Weber, T.O. Wagner, R. Gropp, Expression of human alpha-defensin 5 (HD5) mRNA in nasal and bronchial epithelial cells, *J. Clin. Pathol.* 53 (2000) 770–773.
- [80] N.H. Salzman, D. Ghosh, K.M. Huttner, Y. Paterson, C.L. Bevins, Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin, *Nature* 422 (2003) 522–526.
- [81] H. Chen, Z. Xu, L. Peng, X. Fang, X. Yin, N. Xu, P. Cen, Recent advances in the research and development of human defensins, *Peptides* 27 (2006) 931–940.
- [82] J. Jarczak, E.M. Kościuczek, P. Lisowski, N. Strzałkowska, A. Józwiak, J. Horbańczyk, J. Krzyżewski, L. Zwierzchowski, E. Bagnicka, Defensins: natural component of human innate immunity, *Hum. Immunol.* 74 (2013) 1069–1079.
- [83] R. Bals, X. Wang, Z. Wu, T. Freeman, V. Bafna, M. Zasloff, J.M. Wilson, Human beta-defensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung, *J. Clin. Invest.* 102 (1998) 874–880.
- [84] P.K. Singh, H.P. Jia, K. Wiles, J. Hesselberth, L. Liu, B.A. Conway, E.P. Greenberg, E.V. Valore, M.J. Welsh, T. Ganz, B.F. Tack, P.B. McCray, Production of beta-defensins by human airway epithelia, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (1998) 14961–14966.
- [85] C. Herr, R. Shaykhiyev, R. Bals, The role of cathelicidin and defensins in pulmonary inflammatory diseases, *Expert Opin. Biol. Ther.* 7 (2007) 1449–1461.
- [86] R. Bals, X. Wang, M. Zasloff, J.M. Wilson, The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 (1998) 9541–9546.
- [87] C.I.-U. Chen, S. Schaller-Bals, K.P. Paul, U. Wahn, R. Bals, β -defensins and LL-37 in bronchoalveolar lavage fluid of patients with cystic fibrosis, *J. Cyst. Fibros.* 3 (2004) 45–50.
- [88] M. Zanetti, Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity, *J. Leukoc. Biol.* 75 (2004) 39–48.
- [89] B. Agerberth, J. Charo, J. Werr, B. Olsson, F. Idali, L. Lindbom, R. Kiessling, H. Jörnvall, H. Wigzell, G.H. Gudmundsson, The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations, *Blood* 96 (2000) 3086–3093.
- [90] O.E. Sørensen, P. Follin, A.H. Johnsen, J. Calafat, G.S. Tjabringa, P.S. Hiemstra, N. Borregaard, Human cathelicidin, hCAP-18, is processed to the antimicrobial peptide LL-37 by extracellular cleavage with proteinase 3, *Blood* 97 (2001) 3951–3959.
- [91] E.S. Lysenko, J. Gould, R. Bals, J.M. Wilson, J.N. Weiser, Bacterial phosphatidylcholine decreases susceptibility to the antimicrobial peptide LL-37/hCAP18 expressed in the upper respiratory tract, *Infect. Immun.* 68 (2000) 1664–1671.
- [92] H.P. Koeffler, H. Reichel, J.E. Bishop, A.W. Norman, gamma-Interferon stimulates production of 1,25-dihydroxyvitamin D3 by normal human macrophages, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127 (1985) 596–603.
- [93] B.J. Kim, Y.K. Rho, H.I. Lee, M.S. Jeong, K. Li, S.J. Seo, M.N. Kim, C.K. Hong, The effect of calcipotriol on the expression of human beta defensin-2 and LL-37 in cultured human keratinocytes, *Clin. Dev. Immunol.* 2009 (2009) 645898.
- [94] M. Peric, S. Koglin, S.-M. Kim, S. Morizane, R. Besch, J.C. Prinz, T. Ruzicka, R.L. Gallo, J. Schaubert, IL-17A enhances vitamin D3-induced expression of cathelicidin antimicrobial peptide in human keratinocytes, *J. Immunol.* 181 (2008) 8504–8512.
- [95] V. Nizet, T. Ohtake, X. Lauth, J. Trowbridge, J. Rudisill, R.A. Dorschner, V. Pestonjams, J. Piraino, K. Huttner, R.L. Gallo, Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection, *Nature* 414 (2001) 454–457.
- [96] R. Bals, D.J. Weiner, R.L. Meegalla, J.M. Wilson, Transfer of a cathelicidin peptide antibiotic gene restores bacterial killing in a cystic fibrosis xenograft model, *J. Clin. Invest.* 103 (1999) 1113–1117.
- [97] X. Li, Y. Li, H. Han, D.W. Miller, G. Wang, Solution structures of human LL-37 fragments and NMR-based identification of a minimal membrane-targeting antimicrobial and anticancer region, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 5776–5785.
- [98] G. Bergsson, E.P. Reeves, P. McNally, S.H. Chotirmall, C.M. Greene, P. Grealley, P. Murphy, S.J. O'Neill, N.G. McElvaney, LL-37 complexation with glycosaminoglycans in cystic fibrosis lungs inhibits antimicrobial activity, which can be restored by hypertonic saline, *J. Immunol.* 183 (2009) 543–551.
- [99] O. Kilsård, P. Andersson, M. Malmsten, S.L. Nordin, H.M. Linde, M. Eliasson, E. Sörensen, J.S. Erjefält, J. Bylund, A.I. Olin, O.E. Sørensen, A. Egesten, Peptidylarginine deiminase present in the airways during tobacco smoking and inflammation can citrullinate the host defense peptide LL-37, resulting in altered activities, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 46 (2012) 240–248.
- [100] J. Koziel, D. Bryczek, A. Sroka, K. Maresz, I. Glowczyk, E. Bielecka, T. Kantyka, K. Pyrc, P. Svoboda, J. Pohl, J. Potempa, Citrullination alters immunomodulatory function of LL-37 essential for prevention of endotoxin-induced sepsis, *J. Immunol.* 192 (2014) 5363–5372.
- [101] M. Zaoui, V. Nizet, R.L. Gallo, Antimicrobial and protease inhibitory functions of the human cathelicidin (hCAP18/LL-37) prosequence, *J. Invest. Dermatol.* 120 (2003) 810–816.
- [102] T. Akiyama, F. Niyonsaba, C. Kiatsurayanon, T.T. Nguyen, H. Ushio, T. Fujimura, T. Ueno, K. Okumura, H. Ogawa, S. Ikeda, The human cathelicidin LL-37 host defense peptide upregulates tight junction-related proteins and increases human epidermal keratinocyte barrier function, *J. Innate Immun.* 6 (2014) 739–753.
- [103] A. Neumann, E.T.M. Berends, A. Nerlich, E.M. Molhoek, R.L. Gallo, T. Meerloo, V. Nizet, H.Y. Naim, M. von Köckritz-Blickwede, The antimicrobial peptide LL-37 facilitates the formation of neutrophil extracellular traps, *Biochem. J.* 464 (2014) 3–11.
- [104] A. Neumann, L. Völger, E.T.M. Berends, E.M. Molhoek, D.A.C. Stapels, M. Midon, A. Friães, A. Pingoud, S.H.M. Rooijakkers, R.L. Gallo, M. Mörgelin, V. Nizet, H.Y. Naim, M. von Köckritz-Blickwede, Novel role of the antimicrobial peptide LL-37 in the protection of neutrophil extracellular traps against degradation by bacterial nucleases, *J. Innate Immun.* 6 (2014) 860–868.
- [105] M. Dwyer, Q. Shan, S. D'Ortona, R. Maurer, R. Mitchell, H. Olesen, S. Thiel, J. Huebner, M. Gadjeva, Cystic fibrosis sputum DNA has NETosis characteristics and neutrophil extracellular trap release is regulated by macrophage migration-inhibitory factor, *J. Innate Immun.* 6 (2014) 765–779.
- [106] E. Crouch, J.R. Wright, Surfactant proteins a and d and pulmonary host defense, *Annu. Rev. Physiol.* 63 (2001) 521–554.
- [107] Y. Kuroki, M. Shiratori, Y. Ogasawara, A. Tsuzuki, T. Akino, Characterization of pulmonary surfactant protein D: its copurification with lipids, *Biochim. Biophys. Acta* 1086 (1991) 185–190.
- [108] E.C. Crouch, Collectins and pulmonary host defense, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 19 (1998) 177–201.
- [109] S.J. Dulkerian, L.W. Gonzales, Y. Ning, P.L. Ballard, Regulation of surfactant protein D in human fetal lung, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15 (1996) 781–786.
- [110] O. Seppänen, V. Glumoff, R. Paananen, S. Rounioja, M. Hallman, Transcription factors NF-kappaB and C/EBPdelta and IL-1-induced expression of surfactant protein A in lung explants during the perinatal period, *Biol. Neonate* 87 (2005) 152–159.
- [111] V. Boggaram, M.E. Smith, C.R. Mendelson, Regulation of expression of the gene encoding the major surfactant protein (SP-A) in human fetal lung in vitro. Disparate effects of glucocorticoids on transcription and on mRNA stability, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 11421–11427.
- [112] M. Ikegami, J.A. Whitsett, Z.C. Chronos, G.F. Ross, J.A. Reed, C.J. Bachurski, A.H. Jobe, IL-4 increases surfactant and regulates metabolism in vivo, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 278 (2000) L75–L80.
- [113] M. Fujita, J.M. Shannon, H. Ouchi, D.R. Voelker, Y. Nakanishi, R.J. Mason, Serum surfactant protein D is induced in acute and chronic inflammation in mice, *Cytokine* 31 (2005) 25–33.

- [114] I.Y. Haddad, S. Zhu, H. Ischiropoulos, S. Matalon, Nitration of surfactant protein A results in decreased ability to aggregate lipids, *Am. J. Physiol.* 270 (1996) L281–L288.
- [115] S. Zhu, D.L. Kachel, W.J. Martin, S. Matalon, Nitrated SP-A does not enhance adherence of *Pneumocystis carinii* to alveolar macrophages, *Am. J. Physiol.* 275 (1998) L1031–L1039.
- [116] A.M. LeVine, J.A. Whitsett, Pulmonary collectins and innate host defense of the lung, *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 3 (2001) 161–166.
- [117] S. Stenger, D.A. Hanson, R. Teitelbaum, P. Dewan, K.R. Niazi, C.J. Froelich, T. Ganz, S. Thoma-Uzynski, A. Melián, C. Bogdan, S.A. Porcelli, B.R. Bloom, A.M. Krensky, R.L. Modlin, An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin, *Science* 282 (1998) 121–125.
- [118] F.G. Oppenheim, T. Xu, F.M. McMillian, S.M. Levitz, R.D. Diamond, G.D. Offner, R.F. Troxler, Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*, *J. Biol. Chem.* 263 (1988) 7472–7477.
- [119] J.C. vanderSpek, H.E. Wyandt, J.C. Skare, A. Milunsky, F.G. Oppenheim, R.F. Troxler, Localization of the genes for histatins to human chromosome 4q13 and tissue distribution of the mRNAs, *Am. J. Hum. Genet.* 45 (1989) 381–387.
- [120] A.M. Cole, Y.H. Kim, S. Tahk, T. Hong, P. Weis, A.J. Waring, T. Ganz, Calci-termin, a novel antimicrobial peptide isolated from human airway secretions, *FEBS Lett.* 504 (2001) 5–10.
- [121] F.B. Sow, S. Nandakumar, V. Velu, K.L. Kellar, L.S. Schlesinger, R.R. Amara, W.P. Lafuse, T.M. Shinnick, S.B. Sable, *Mycobacterium tuberculosis* components stimulate production of the antimicrobial peptide hepcidin, *Tuberc. Edinb. Scotl* 91 (2011) 314–321.
- [122] P. Strnad, P. Schwarz, M.C.D. Rasenack, O. Kucukoglu, R.I. Habib, D. Heuberger, R. Eehalt, M.W. Müller, A. Stiehl, G. Adler, H. Kulaksiz, Hepcidin is an antibacterial, stress-inducible peptide of the biliary system, *PLoS One* 6 (2011) e16454.
- [123] W.M. Weston, E.E. LeClair, W. Trzyna, K.M. McHugh, P. Nugent, C.M. Lafferty, L. Ma, R.S. Tuan, R.M. Greene, Differential display identification of plunc, a novel gene expressed in embryonic palate, nasal epithelium, and adult lung, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 13698–13703.
- [124] E.A. Nordahl, V. Rydengård, M. Mörgelin, A. Schmidtchen, Domain 5 of high molecular weight kininogen is antibacterial, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 34832–34839.
- [125] K. Kowalska, D.B. Carr, A.W. Lipkowski, Direct antimicrobial properties of substance P, *Life Sci.* 71 (2002) 747–750.
- [126] I.-M. Frick, P. Akesson, H. Herwald, M. Mörgelin, M. Malmsten, D.K. Nägler, L. Björck, The contact system—a novel branch of innate immunity generating antibacterial peptides, *EMBO J.* 25 (2006) 5569–5578.
- [127] S. Oehmcke, O. Shannon, M. von Köckritz-Blickwede, M. Mörgelin, A. Linder, A.I. Olin, L. Björck, H. Herwald, Treatment of invasive streptococcal infection with a peptide derived from human high-molecular weight kininogen, *Blood* 114 (2009) 444–451.
- [128] J.A. Voynow, B.K. Rubin, Mucins, mucus, and sputum, *Chest* 135 (2009) 505–512.
- [129] A.R. Berkebile, P.B. McCray, Effects of airway surface liquid pH on host defense in cystic fibrosis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 52 (2014) 124–129.
- [130] P.J. Barnes, Inhaled corticosteroids are not beneficial in chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161 (2000) 342–344 discussion 344.
- [131] D. Islam, L. Bandholtz, J. Nilsson, H. Wigzell, B. Christensson, B. Agerberth, G. Gudmundsson, Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator, *Nat. Med.* 7 (2001) 180–185.
- [132] I. Virella-Lowell, A. Poirier, K.A. Chesnut, M. Brantly, T.R. Flotte, Inhibition of recombinant adeno-associated virus (rAAV) transduction by bronchial secretions from cystic fibrosis patients, *Gene Ther.* 7 (2000) 1783–1789.
- [133] W. Xiao, Y.-P. Hsu, A. Ishizaka, T. Kirikae, R.B. Moss, Sputum cathelicidin, urokinase plasminogen activation system components, and cytokines discriminate cystic fibrosis, COPD, and asthma inflammation, *Chest* 128 (2005) 2316–2326.
- [134] J.M. Sallenave, M. Si Tahar, G. Cox, M. Chignard, J. Gauldie, Secretory leukocyte proteinase inhibitor is a major leukocyte elastase inhibitor in human neutrophils, *J. Leukoc. Biol.* 61 (1997) 695–702.
- [135] S.D. Sagel, M.K. Sontag, F.J. Accurso, Relationship between antimicrobial proteins and airway inflammation and infection in cystic fibrosis, *Pediatr. Pulmonol.* 44 (2009) 402–409.
- [136] M. Griesse, R. Essl, R. Schmidt, E. Rietschel, F. Ratjen, M. Ballmann, K. Paul, Pulmonary surfactant, lung function, and endobronchial inflammation in cystic fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170 (2004) 1000–1005.
- [137] A.B. Thompson, T. Bohling, F. Payvandi, S.I. Rennard, Lower respiratory tract lactoferrin and lysozyme arise primarily in the airways and are elevated in association with chronic bronchitis, *J. Lab. Clin. Med.* 115 (1990) 148–158.
- [138] M.J. Goldman, G.M. Anderson, E.D. Stolzberg, U.P. Kari, M. Zasloff, J.M. Wilson, Human β -defensin-1 is a salt-sensitive antibiotic in lung that is inactivated in cystic fibrosis, *Cell* 88 (1997) 553–560.
- [139] R. Bals, D.J. Weiner, R.L. Meegalla, F. Accurso, J.M. Wilson, Salt-independent abnormality of antimicrobial activity in cystic fibrosis airway surface fluid, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 25 (2001) 21–25.
- [140] D.J. Weiner, R. Bucki, P.A. Janmey, The antimicrobial activity of the cathelicidin LL37 is inhibited by F-actin bundles and restored by gelsolin, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28 (2003) 738–745.
- [141] R. Bucki, F.J. Byfield, P.A. Janmey, Release of the antimicrobial peptide LL-37 from DNA/F-actin bundles in cystic fibrosis sputum, *Eur. Respir. J.* 29 (2007) 624–632.
- [142] E.P. Reeves, D.A. Bergin, M.A. Murray, N.G. McElvaney, The involvement of glycosaminoglycans in airway disease associated with cystic fibrosis, *ScientificWorld J.* 11 (2011) 959–971.
- [143] T. Schulz, U. Schumacher, C. Prante, W. Sextro, P. Prehm, Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator can export hyaluronan, *Pathobiol. J. Immunopathol. Mol. Cell. Biol.* 77 (2010) 200–209.
- [144] N. Solic, J. Wilson, S.J. Wilson, J.K. Shute, Endothelial activation and increased heparan sulfate expression in cystic fibrosis, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172 (2005) 892–898.
- [145] H. Rahmoune, G. Lamblin, J.-J. Lafitte, C. Galabert, M. Filliat, P. Roussel, chondroitin sulfate in sputum from patients with cystic fibrosis and chronic bronchitis, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 5 (1991) 315–320.
- [146] N.K. Mohapatra, P.W. Cheng, J.C. Parker, A.M. Paradiso, J.R. Yankaskas, R.C. Boucher, T.F. Boat, Alteration of sulfation of glycoconjugates, but not sulfate transport and intracellular inorganic sulfate content in cystic fibrosis airway epithelial cells, *Pediatr. Res.* 38 (1995) 42–48.
- [147] S. Newport, N. Amin, A.J. Dozor, Exhaled breath condensate pH and ammonia in cystic fibrosis and response to treatment of acute pulmonary exacerbations, *Pediatr. Pulmonol.* 44 (2009) 866–872.
- [148] Y. Song, D. Salinas, D.W. Nielson, A.S. Verkman, Hyperacidity of secreted fluid from submucosal glands in early cystic fibrosis, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 290 (2006) C741–C749.
- [149] K.R. Bhaskar, D.H. Gong, R. Bansil, S. Pajevic, J.A. Hamilton, B.S. Turner, J.T. LaMont, Profound increase in viscosity and aggregation of pig gastric mucin at low pH, *Am. J. Physiol.* 261 (1991) G827–G832.
- [150] R. Bansil, B.S. Turner, Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications, *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 11 (2006) 164–170.
- [151] J. Johansson, G.H. Gudmundsson, M.E. Rottenberg, K.D. Berndt, B. Agerberth, Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 3718–3724.
- [152] T.B. McNeely, D.C. Shugars, M. Rosendahl, C. Tucker, S.P. Eisenberg, S.M. Wahl, Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by secretory leukocyte protease inhibitor occurs prior to viral reverse transcription, *Blood* 90 (1997) 1141–1149.
- [153] H. Wu, A. Kuzmenko, S. Wan, L. Schaffer, A. Weiss, J.H. Fisher, K.S. Kim, F.X. McCormack, Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability, *J. Clin. Invest* 111 (2003) 1589–1602.
- [154] K. Nakayama, Y.X. Jia, H. Hirai, M. Shinkawa, M. Yamaya, K. Sekizawa, H. Sasaki, Acid stimulation reduces bactericidal activity of surface liquid in cultured human airway epithelial cells, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26 (2002) 105–113.
- [155] H.P. Haagsman, S. Hawgood, T. Sargeant, D. Buckley, R.T. White, K. Drickamer, B.J. Benson, The major lung surfactant protein, SP 28-36, is a calcium-dependent, carbohydrate-binding protein, *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 13877–13880.
- [156] A. Persson, D. Chang, E. Crouch, Surfactant protein D is a divalent cation-dependent carbohydrate-binding protein, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 5755–5760.
- [157] G. Viegi, A. Scognamiglio, S. Baldacci, F. Pistelli, L. Carrozzi, Epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* 68 (2001) 4–19.
- [158] R.M. Tuder, I. Petrache, Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease, *J. Clin. Invest* 122 (2012) 2749–2755.
- [159] A.T. Hill, E.J. Campbell, S.L. Hill, D.L. Bayley, R.A. Stockley, Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis, *Am. J. Med.* 109 (2000) 288–295.
- [160] C.L. Chin, I.J. Manzel, E.E. Lehman, A.L. Humlicek, L. Shi, T.D. Starner, G.M. Denning, T.F. Murphy, S. Sethi, D.C. Look, *Haemophilus influenzae* from patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation induce more inflammation than colonizers, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172 (2005) 85–91.
- [161] S. Gompertz, C. O'Brien, D.L. Bayley, S.L. Hill, R.A. Stockley, Changes in bronchial inflammation during acute exacerbations of chronic bronchitis, *Eur. Respir. J.* 17 (2001) 1112–1119.
- [162] I. Rahman, D. Morrison, K. Donaldson, W. MacNee, Systemic oxidative stress in asthma, COPD, and smokers, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 154 (1996) 1055–1060.
- [163] J. Almirall, J. Blanquer, S. Bello, Community-acquired pneumonia among smokers, *Arch. Bronconeumol* 50 (2014) 250–254.
- [164] C. Herr, G. Han, D. Li, T. Tschernig, Q.T. Dinh, C. Beißwenger, R. Bals, Combined exposure to bacteria and cigarette smoke resembles characteristic phenotypes of human COPD in a murine disease model, *Exp. Toxicol. Pathol. Off. J. Ges. Für Toxikol. Pathol.* 67 (2015) 261–269.
- [165] E. Monsó, J. Ruiz, A. Rosell, J. Manterola, J. Fiz, J. Morera, V. Ausina, Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 152 (1995) 1316–1320.
- [166] R. Zalacain, V. Sobradillo, J. Amilibia, J. Barrón, V. Achótegui, J.I. Pijoan, J.L. Llorente, Predisposing factors to bacterial colonization in chronic

- obstructive pulmonary disease, *Eur. Respir. J.* 13 (1999) 343–348.
- [167] S. Sethi, T.F. Murphy, Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease, *N. Engl. J. Med.* 359 (2008) 2355–2365.
- [168] D.C. Currie, J.C. Cooke, A.D. Morgan, I.H. Kerr, D. Delany, B. Strickland, P.J. Cole, Interpretation of bronchograms and chest radiographs in patients with chronic sputum production, *Thorax* 42 (1987) 278–284.
- [169] G. Paone, V. Conti, A. Leone, G. Schmid, G. Giannunzio, C. Terzano, Human neutrophil peptides sputum levels in symptomatic smokers and COPD patients, *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 15 (2011) 556–562.
- [170] E. Pace, A. Giarratano, M. Ferraro, A. Bruno, L. Siena, S. Mangione, M. Johnson, M. Gjomarkaj, TLR4 upregulation underpins airway neutrophilia in smokers with chronic obstructive pulmonary disease and acute respiratory failure, *Hum. Immunol.* 72 (2011) 54–62.
- [171] M. Tsoumakidou, I. Bouloukaki, K. Thimaki, N. Tzanakis, N.M. Siafakas, Innate immunity proteins in chronic obstructive pulmonary disease and idiopathic pulmonary fibrosis, *Exp. Lung Res.* 36 (2010) 373–380.
- [172] Y.-Y. Jiang, W. Xiao, M.-X. Zhu, Z.-H. Yang, X.-J. Pan, Y. Zhang, C.-C. Sun, Y. Xing, The effect of human antibacterial peptide LL-37 in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease, *Respir. Med.* 106 (2012) 1680–1689.
- [173] M. Golec, C. Reichel, M. Lemieszek, B. Mackiewicz, J. Buczkowski, J. Sitkowska, C. Skórska, J. Dutkiewicz, J. Milanowski, R. Ziesche, Cathelicidin LL-37 in bronchoalveolar lavage and epithelial lining fluids from COPD patients and healthy individuals, *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 26 (2012) 617–625.
- [174] G.I. Parameswaran, S. Sethi, T.F. Murphy, Effects of bacterial infection on airway antimicrobial peptides and proteins in COPD, *Chest* 140 (2011) 611–617.
- [175] P. Mallia, J. Footitt, R. Sotero, A. Jepson, M. Contoli, M.-B. Trujillo-Torralbo, T. Kebadze, J. Aniscentko, G. Oleszkiewicz, K. Gray, S.D. Message, K. Ito, P.J. Barnes, I.M. Adcock, A. Papi, et al., Rhinovirus infection induces degradation of antimicrobial peptides and secondary bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 186 (2012) 1117–1124.
- [176] N. Ishikawa, N. Hattori, S. Tanaka, Y. Horimasu, Y. Haruta, A. Yokoyama, N. Kohno, V.L. Kinnula, Levels of surfactant proteins A and D and KL-6 are elevated in the induced sputum of chronic obstructive pulmonary disease patients: a sequential sputum analysis, *Respir. Int. Rev. Thorac. Dis.* 82 (2011) 10–18.
- [177] S. Ohlmeier, M. Vuolanto, T. Toljamo, K. Vuopala, K. Salmenkivi, M. Myllärniemi, V.L. Kinnula, Proteomics of human lung tissue identifies surfactant protein A as a marker of chronic obstructive pulmonary disease, *J. Proteome Res.* 7 (2008) 5125–5132.
- [178] C. Herr, C. Beisswenger, C. Hess, K. Kandler, N. Suttrop, T. Welte, J.-M. Schroeder, C. Vogelmeier, R. Bals for the CAPNETZ study group, suppression of pulmonary innate host defence in smokers, *Thorax* 64 (2009) 144–149.
- [179] Q. Hamid, M. Tulic, Immunobiology of asthma, *Annu. Rev. Physiol.* 71 (2009) 489–507.
- [180] M. Masoli, D. Fabian, S. Holt, R. Beasley, Global initiative for asthma (GINA) program, the global burden of asthma: executive summary of the GINA dissemination committee report, *Allergy* 59 (2004) 469–478.
- [181] I.M. Adcock, G. Caramori, K.F. Chung, New targets for drug development in asthma, *Lancet Lond. Engl.* 372 (2008) 1073–1087.
- [182] W.W. Busse, R.F. Lemanske, J.E. Gern, Role of viral respiratory infections in asthma and asthma exacerbations, *Lancet Lond. Engl.* 376 (2010) 826–834.
- [183] G. Rohde, S.D. Message, J.J. Haas, T. Kebadze, H. Parker, V. Laza-Stanca, M.R. Khativ, O.M. Kon, L.A. Stanciu, P. Mallia, M.R. Edwards, S.L. Johnston, CXC chemokines and antimicrobial peptides in rhinovirus-induced experimental asthma exacerbations, *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 44 (2014) 930–939.
- [184] E.A. van de Graaf, T.A. Out, A. Kobesen, H.M. Jansen, Lactoferrin and secretory IgA in the bronchoalveolar lavage fluid from patients with a stable asthma, *Lung* 169 (1991) 275–283.
- [185] J.V. Fahy, D.J. Steiger, J. Liu, C.B. Basbaum, W.E. Finkbeiner, H.A. Boushey, Markers of mucus secretion and DNA levels in induced sputum from asthmatic and from healthy subjects, *Am. Rev. Respir. Dis.* 147 (1993) 1132–1137.
- [186] G. Cheng, T. Ueda, T. Numao, Y. Kuroki, H. Nakajima, Y. Fukushima, S. Motojima, T. Fukuda, Increased levels of surfactant protein A and D in bronchoalveolar lavage fluids in patients with bronchial asthma, *Eur. Respir. J.* 16 (2000) 831–835.
- [187] M. Hilty, C. Burke, H. Pedro, P. Cardenas, A. Bush, C. Bossley, J. Davies, A. Ervine, L. Poulter, L. Pachter, M.F. Moffatt, W.O.C. Cookson, Disordered microbial communities in asthmatic airways, *PLoS One* 5 (2010) e8578.
- [188] R.P. Dickson, F.J. Martinez, G.B. Huffnagle, The role of the microbiome in exacerbations of chronic lung diseases, *Lancet Lond. Engl.* 384 (2014) 691–702.
- [189] C.M. Greene, N.G. McElvaney, Proteases and antiproteases in chronic neutrophilic lung disease – relevance to drug discovery, *Br. J. Pharmacol.* 158 (2009) 1048–1058.
- [190] A. Sullivan, R. Stockley, Proteinases in COPD, in: T. Hansel, P. Barnes (Eds.), *Recent Adv. Pathophysiol. COPD*, Birkhäuser Basel, 2004, pp. 75–99.
- [191] H. Wada, H. Takizawa, Future treatment for COPD: targeting oxidative stress and its related signal, *Recent Pat. Inflamm. Allergy Drug Discov.* 7 (2013) 1–11.
- [192] B. Korkmaz, M.S. Horwitz, D.E. Jenne, F. Gauthier, Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases, *Pharmacol. Rev.* 62 (2010) 726–759.
- [193] C.A. Owen, M.A. Campbell, S.S. Boukades, E.J. Campbell, Cytokines regulate membrane-bound leukocyte elastase on neutrophils: a novel mechanism for effector activity, *Am. J. Physiol.* 272 (1997) L385–L393.
- [194] A. Belaouaj, R. McCarthy, M. Baumann, Z. Gao, T.J. Ley, S.N. Abraham, S.D. Shapiro, Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis, *Nat. Med.* 4 (1998) 615–618.
- [195] V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D.S. Weiss, Y. Weinrauch, A. Zychlinsky, Neutrophil extracellular traps kill bacteria, *Science* 303 (2004) 1532–1535.
- [196] A. Belaouaj, K.S. Kim, S.D. Shapiro, Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase, *Science* 289 (2000) 1185–1188.
- [197] T.O. Hirche, R. Benabid, G. Deslee, S. Gangloff, S. Achilefu, M. Guenounou, F. Lebargy, R.E. Hancock, A. Belaouaj, Neutrophil elastase mediates innate host protection against *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Immunol.* 181 (2008) 4945–4954.
- [198] G.L. Snider, Chronic obstructive pulmonary disease: risk factors, pathophysiology and pathogenesis, *Annu. Rev. Med.* 40 (1989) 411–429.
- [199] J.A. Voynow, B.M. Fischer, S. Zheng, Proteases and cystic fibrosis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40 (2008) 1238–1245.
- [200] V. Balloy, J.-M. Sallenave, B. Crestani, M. Dehoux, M. Chignard, Neutrophil DNA contributes to the antileukocyte barrier during acute lung inflammation, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28 (2003) 746–753.
- [201] M.C. Bruce, L. Poncz, J.D. Klinger, R.C. Stern, J.F. Tomashefski, D.G. Dearborn, Biochemical and pathologic evidence for proteolytic destruction of lung connective tissue in cystic fibrosis, *Am. Rev. Respir. Dis.* 132 (1985) 529–535.
- [202] I. Garcia-Verdugo, D. Descamps, M. Chignard, L. Touqui, J.-M. Sallenave, Lung protease/anti-protease network and modulation of mucus production and surfactant activity, *Biochimie* 92 (2010) 1608–1617.
- [203] P. Geraghty, M.P. Rogan, C.M. Greene, R.M.M. Boxio, T. Poiriert, M. O'Mahony, A. Belaouaj, S.J. O'Neill, C.C. Taggart, N.G. McElvaney, Neutrophil elastase up-regulates cathepsin B and matrix metalloproteinase-2 expression, *J. Immunol.* 178 (2007) 5871–5878.
- [204] M. Le Gars, D. Descamps, D. Roussel, E. Saussereau, L. Guillot, M. Ruffin, O. Taly, S.-S. Hong, P. Boulanger, M. Paulais, L. Malleret, A. Belaouaj, A. Edelman, M. Huerre, M. Chignard, et al., Neutrophil elastase degrades cystic fibrosis transmembrane conductance regulator via calpains and disables channel function in vitro and in vivo, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 187 (2013) 170–179.
- [205] D.J. Buttle, M. Abrahamson, D. Burnett, J.S. Mort, A.J. Barrett, P.M. Dando, S.L. Hill, Human sputum cathepsin B degrades proteoglycan, is inhibited by alpha 2-macroglobulin and is modulated by neutrophil elastase cleavage of cathepsin B precursor and cystatin C, *Biochem. J.* 276 (Pt 2) (1991) 325–331.
- [206] Y. Itoh, H. Nagase, Preferential inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 that is bound to the precursor of matrix metalloproteinase 9 (progelatinase B) by human neutrophil elastase, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 16518–16521.
- [207] Y. Okada, S. Watanabe, I. Nakanishi, J. Kishi, T. Hayakawa, W. Watorek, J. Travis, H. Nagase, Inactivation of tissue inhibitor of metalloproteinases by neutrophil elastase and other serine proteinases, *FEBS Lett.* 229 (1988) 157–160.
- [208] J.-M. Sallenave, S. Shapiro, Proteases and antiproteases in development, homeostasis and disease: The old, the new, and the unknown, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40 (2008) 1066–1067.
- [209] N.C. Perera, O. Schilling, H. Kittel, W. Back, E. Kremmer, D.E. Jenne, NSP4, an elastase-related protease in human neutrophils with arginine specificity, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109 (2012) 6229–6234.
- [210] H.R.P. Miller, A.D. Pemberton, Tissue-specific expression of mast cell granule serine proteinases and their role in inflammation in the lung and gut, *Immunology* 105 (2002) 375–390.
- [211] T.O. Hirche, E.C. Crouch, M. Espinola, T.J. Brokelman, R.P. Mecham, N. DeSilva, J. Cooley, E. Remold-O'Donnell, A. Belaouaj, Neutrophil serine proteinases inactivate surfactant protein D by cleaving within a conserved subregion of the carbohydrate recognition domain, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 27688–27698.
- [212] J. Cooley, T.K. Takayama, S.D. Shapiro, N.M. Schechter, E. Remold-O'Donnell, The serpin MNEI inhibits elastase-like and chymotrypsin-like serine proteases through efficient reactions at two active sites, *Biochemistry* 40 (2001) 15762–15770.
- [213] T. Fera, R.T. Abboud, A. Richter, S.S. Johal, Acute effect of smoking on elastase-like esterolytic activity and immunologic neutrophil elastase levels in bronchoalveolar lavage fluid, *Am. Rev. Respir. Dis.* 133 (1986) 568–573.
- [214] J.E. Gadek, G.A. Fells, R.G. Crystal, Cigarette smoking induces functional antiprotease deficiency in the lower respiratory tract of humans, *Science* 206 (1979) 1315–1316.
- [215] H. Carp, F. Miller, J.R. Hoidal, A. Janoff, Potential mechanism of emphysema: alpha 1-proteinase inhibitor recovered from lungs of cigarette smokers contains oxidized methionine and has decreased elastase inhibitory capacity, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79 (1982) 2041–2045.
- [216] P.J. Stone, J.D. Calore, S.E. McGowan, J. Bernardo, G.L. Snider, C. Franzblau, Functional alpha 1-protease inhibitor in the lower respiratory tract of

- cigarette smokers is not decreased, *Science* 221 (1983) 1187–1189.
- [217] D.A. Johnson, A.J. Barrett, R.W. Mason, Cathepsin L inactivates alpha 1-proteinase inhibitor by cleavage in the reactive site region, *J. Biol. Chem.* 261 (1986) 14748–14751.
 - [218] Z. Liu, X. Zhou, S.D. Shapiro, J.M. Shipley, S.S. Twining, L.A. Diaz, R.M. Senior, Z. Werb, The serpin alpha1-proteinase inhibitor is a critical substrate for gelatinase B/MMP-9 in vivo, *Cell* 102 (2000) 647–655.
 - [219] S. Chandler, J. Cossins, J. Lury, G. Wells, Macrophage metalloelastase degrades matrix and myelin proteins and processes a tumour necrosis factor-alpha fusion protein, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228 (1996) 421–429.
 - [220] W. MacNee, Oxidants/antioxidants and COPD, *Chest* 117 (2000) 303S–317S.
 - [221] D. Johnson, J. Travis, Structural evidence for methionine at the reactive site of human alpha-1-proteinase inhibitor, *J. Biol. Chem.* 253 (1978) 7142–7144.
 - [222] R. Heinzel-Wieland, G.J. Steffens, L. Flohé, Inhibitory characteristics and oxidant resistance of site specific variants of recombinant human anti-leukoprotease (ALP), *Biomed. Biochim. Acta* 50 (1991) 677–681.
 - [223] E. Cavarra, M. Lucattelli, F. Gambelli, B. Bartalesi, S. Fineschi, A. Szarka, F. Giannerini, P.A. Martorana, G. Lungarella, Human SLPI inactivation after cigarette smoke exposure in a new in vivo model of pulmonary oxidative stress, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 281 (2001) L412–L417.
 - [224] C.C. Taggart, G.J. Lowe, C.M. Greene, A.T. Mulgrew, S.J. O'Neill, R.L. Levine, N.G. McElvaney, Cathepsin B, L, and S cleave and inactivate secretory leucoprotease inhibitor, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 33345–33352.
 - [225] S. Weldon, P. McNally, N.G. McElvaney, J.S. Elborn, D.F. McAuley, J. Wartelle, A. Belaouaj, R.L. Levine, C.C. Taggart, Decreased levels of secretory leucoprotease inhibitor in the *Pseudomonas*-infected cystic fibrosis lung are due to neutrophil elastase degradation, *J. Immunol.* 183 (2009) 8148–8156.
 - [226] N. Guyot, M.W. Butler, P. McNally, S. Weldon, C.M. Greene, R.L. Levine, S.J. O'Neill, C.C. Taggart, N.G. McElvaney, Elafin, an elastase-specific inhibitor, is cleaved by its cognate enzyme neutrophil elastase in sputum from individuals with cystic fibrosis, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 32377–32385.
 - [227] D. Jiang, S.E. Wenzel, Q. Wu, R.P. Bowler, C. Schnell, H.W. Chu, Human neutrophil elastase degrades SPLUNC1 and impairs airway epithelial defense against bacteria, *PLoS One* 8 (2013) e64689.
 - [228] D. Rodríguez, C.J. Morrison, C.M. Overall, Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics, *Biochim. Biophys. Acta* 1803 (2010) 39–54.
 - [229] A. Gaggari, A. Hector, P.E. Bratcher, M.A. Mall, M. Griesse, D. Hartl, The role of matrix metalloproteinases in cystic fibrosis lung disease, *Eur. Respir. J.* 38 (2011) 721–727.
 - [230] J.B. Trojanek, A. Cobos-Correa, S. Diemer, M. Kormann, S.C. Schubert, Z. Zhou-Suckow, R. Agrawal, J. Duerr, C.J. Wagner, J. Schatterny, S. Hirtz, O. Sommerburg, D. Hartl, C. Schultz, M.A. Mall, Airway mucus obstruction triggers macrophage activation and matrix metalloproteinase 12-dependent emphysema, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 51 (2014) 709–720.
 - [231] S.D. Sagel, R.K. Kapsner, I. Osberg, Induced sputum matrix metalloproteinase-9 correlates with lung function and airway inflammation in children with cystic fibrosis, *Pediatr. Pulmonol.* 39 (2005) 224–232.
 - [232] R. Khokha, A. Murthy, A. Weiss, Metalloproteinases and their natural inhibitors in inflammation and immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013) 649–665.
 - [233] W.C. Parks, C.L. Wilson, Y.S. López-Boado, Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity, *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 617–629.
 - [234] D. Drey Mueller, S. Uhlig, A. Ludwig, ADAM-family metalloproteinases in lung inflammation: potential therapeutic targets, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 308 (2015) L325–L343.
 - [235] S. Molet, C. Belleguic, H. Lena, N. Germain, C.P. Bertrand, S.D. Shapiro, J.-M. Plaqueois, P. Delaval, V. Lagente, Increase in macrophage elastase (MMP-12) in lungs from patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. AI* 54 (2005) 31–36.
 - [236] M. Roderfeld, T. Rath, R. Schulz, W. Seeger, A. Tschuschner, J. Graf, E. Roeb, Serum matrix metalloproteinases in adult CF patients: Relation to pulmonary exacerbation, *J. Cyst. Fibros. Off. J. Eur. Cyst. Fibros. Soc.* 8 (2009) 338–347.
 - [237] R. Chaudhuri, C. McSharry, J. Brady, I. Donnelly, C. Grierson, S. McGuinness, L. Jolly, C.J. Weir, C.M. Messow, M. Spears, G. Miele, K. Nock, D. Crowther, J. Thompson, M. Brannigan, et al., Sputum matrix metalloproteinase-12 in patients with chronic obstructive pulmonary disease and asthma: relationship to disease severity, *J. Allergy Clin. Immunol.* 129 (2012) 655–663 e8.
 - [238] I. Haq, G.E. Lowrey, N. Kalsheker, S.R. Johnson, Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) SNP affects MMP activity, lung macrophage infiltration and protects against emphysema in COPD, *Thorax* 66 (2011) 970–976.
 - [239] H.S. Deshmukh, C. Shaver, L.M. Case, M. Dietsch, S.C. Wesselkamper, W.D. Hardie, T.R. Korfhagen, M. Corradi, J.A. Nadel, M.T. Borchers, G.D. Leikauf, Acrolein-activated matrix metalloproteinase 9 contributes to persistent mucin production, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 38 (2008) 446–454.
 - [240] N. Louhelainen, H. Stark, W. Mazur, P. Ryttilä, R. Djukanovic, V.L. Kinnula, Elevation of sputum matrix metalloproteinase-9 persists up to 6 months after smoking cessation: a research study, *BMC Pulm. Med.* 10 (2010) 13.
 - [241] R.D. Hautamaki, D.K. Kobayashi, R.M. Senior, S.D. Shapiro, Requirement for macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice, *Science* 277 (1997) 2002–2004.
 - [242] S. Lanone, T. Zheng, Z. Zhu, W. Liu, C.G. Lee, B. Ma, Q. Chen, R.J. Homer, J. Wang, L.A. Rabach, M.E. Rabach, J.M. Shipley, S.D. Shapiro, R.M. Senior, J.A. Elias, Overlapping and enzyme-specific contributions of matrix metalloproteinases-9 and -12 in IL-13-induced inflammation and remodeling, *J. Clin. Invest* 110 (2002) 463–474.
 - [243] K. Hirano, T. Sakamoto, Y. Uchida, Y. Morishima, K. Masuyama, Y. Ishii, A. Nomura, M. Ohtsuka, K. Sekizawa, Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease, *Eur. Respir. J.* 18 (2001) 748–752.
 - [244] A.E. Hegab, T. Sakamoto, Y. Uchida, A. Nomura, Y. Ishii, Y. Morishima, M. Mochizuki, T. Kimura, W. Saitoh, T. Kiwamoto, T. Iizuka, H.H. Massoud, H.M. Massoud, K.M. Hassanein, K. Sekizawa, Association analysis of tissue inhibitor of metalloproteinase2 gene polymorphisms with COPD in Egyptians, *Respir. Med.* 99 (2005) 107–110.
 - [245] G.M. Hunninghake, M.H. Cho, Y. Tesfaigzi, M.E. Soto-Quiros, L. Avila, J. Lasky-Su, C. Stidley, E. Melén, C. Söderhäll, J. Hallberg, I. Kull, J. Kere, M. Svartengren, G. Pershagen, M. Wickman, et al., MMP12, lung function, and COPD in high-risk populations, *N. Engl. J. Med.* 361 (2009) 2599–2608.
 - [246] D. Cataldo, C. Munaut, A. Noël, F. Frankenne, P. Bartsch, J.M. Foidart, R. Louis, MMP-2- and MMP-9-linked gelatinolytic activity in the sputum from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 123 (2000) 259–267.
 - [247] Y.C. Lee, H.B. Lee, Y.K. Rhee, C.H. Song, The involvement of matrix metalloproteinase-9 in airway inflammation of patients with acute asthma, *Clin. Exp. Allergy J. Br. Soc. Allergy Clin. Immunol.* 31 (2001) 1623–1630.
 - [248] Z. Han, Junxu, N. Zhong, Expression of matrix metalloproteinases MMP-9 within the airways in asthma, *Respir. Med.* 97 (2003) 563–567.
 - [249] K. Prikk, P. Maisi, E. Piriä, M.-A. Reintam, T. Salo, T. Sorsa, R. Sepper, Airway obstruction correlates with collagenase-2 (MMP-8) expression and activation in bronchial asthma, *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 82 (2002) 1535–1545.
 - [250] A. Gaggari, Y. Li, N. Weathington, M. Winkler, M. Kong, P. Jackson, J.E. Blalock, J.P. Clancy, Matrix metalloproteinase-9 dysregulation in lower airway secretions of cystic fibrosis patients, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 293 (2007) L96–L104.
 - [251] C.L. Wilson, A.J. Ouellette, D.P. Satchell, T. Ayabe, Y.S. López-Boado, J.L. Stratman, S.J. Hultgren, L.M. Matrisian, W.C. Parks, Regulation of intestinal alpha-defensin activation by the metalloproteinase matrilysin in innate host defense, *Science* 286 (1999) 113–117.
 - [252] C.L. Wilson, A.P. Schmidt, E. Piriä, E.V. Valore, N. Ferri, T. Sorsa, T. Ganz, W.C. Parks, Differential processing of {alpha}- and {beta}-defensin precursors by matrix metalloproteinase-7 (MMP-7), *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 8301–8311.
 - [253] S.E. Dunsmore, U.K. Saarialho-Kere, J.D. Roby, C.L. Wilson, L.M. Matrisian, H.G. Welgus, W.C. Parks, Matrilysin expression and function in airway epithelium, *J. Clin. Invest* 102 (1998) 1321–1331.
 - [254] F. Ratjen, C.-M. Hartog, K. Paul, J. Wermelt, J. Braun, Matrix metalloproteinases in BAL fluid of patients with cystic fibrosis and their modulation by treatment with dornase alpha, *Thorax* 57 (2002) 930–934.
 - [255] K.J. Greenlee, Z. Werb, F. Kheradmand, Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted, *Physiol. Rev.* 87 (2007) 69–98.
 - [256] A.M. Houghton, W.O. Hartzell, C.S. Robbins, F.X. Gomis-Rüth, S.D. Shapiro, Macrophage elastase kills bacteria within murine macrophages, *Nature* 460 (2009) 637–641.
 - [257] H. Nagase, K. Suzuki, T.E. Cawston, K. Brew, Involvement of a region near valine-69 of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 in the interaction with matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1), *Biochem. J.* 325 (Pt 1) (1997) 163–167.
 - [258] P.L. Jackson, X. Xu, L. Wilson, N.M. Weathington, J.P. Clancy, J.E. Blalock, A. Gaggari, Human neutrophil elastase-mediated cleavage sites of MMP-9 and TIMP-1: implications to cystic fibrosis proteolytic dysfunction, *Mol. Med. Camb. Mass* 16 (2010) 159–166.
 - [259] S.D. Shapiro, N.M. Goldstein, A.M. Houghton, D.K. Kobayashi, D. Kelley, A. Belaouaj, Neutrophil elastase contributes to cigarette smoke-induced emphysema in mice, *Am. J. Pathol.* 163 (2003) 2329–2335.
 - [260] J. Reiser, B. Adair, T. Reinheckel, Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease, *J. Clin. Invest* 120 (2010) 3421–3431.
 - [261] V. Turk, V. Stoka, O. Vasiljeva, M. Renko, T. Sun, B. Turk, D. Turk, Cysteine cathepsins: From structure, function and regulation to new frontiers, proteolysis 50 Years Discov. *Lysosome* 1824 (2012) 68–88.
 - [262] N.D. Rawlings, M. Waller, A.J. Barrett, A. Bateman, MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) D503–D509.
 - [263] K. Müntener, R. Zwicky, G. Csucs, J. Rohrer, A. Baici, Exon skipping of cathepsin B: mitochondrial targeting of a lysosomal peptidase provokes cell death, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 41012–41017.
 - [264] N. Puri, P.A. Roche, Mast cells possess distinct secretory granule subsets whose exocytosis is regulated by different SNARE isoforms, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 2580–2585.
 - [265] S. Sever, M.M. Altintas, S.R. Nankoe, C.C. Möller, D. Ko, C. Wei, J. Henderson, E.C. del Re, L. Hsing, A. Erickson, C.D. Cohen, M. Kretzler, D. Kerjaschki, A. Rudensky, B. Nikolic, et al., Proteolytic processing of dynamin by cytoplasmic cathepsin L is a mechanism for proteinuric kidney disease, *J. Clin. Invest* 117 (2007) 2095–2104.
 - [266] B. Goulet, A. Baruch, N.-S. Moon, M. Poirier, L.L. Sansregret, A. Erickson, M. Bogyo, A. Nepveu, 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 (2004) 207–219.
- [267] E.M. Duncan, T.L. Muratore-Schroeder, R.G. Cook, B.A. Garcia, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, C.D. Allis, Cathepsin L proteolytically processes histone H3 during mouse embryonic stem cell differentiation, *Cell.* 135 (2008) 284–294.
- [268] K. Brix, A. Dunkhorst, M. Mayer, S. Jordans, Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions, *Biochimie* 90 (2008) 194–207.
- [269] D. Brömme, S. Wilson, Role of cysteine cathepsins in extracellular proteolysis, in: W.C. Parks, R.P. Mecham (Eds.), *Extracell. Matrix Degrad.*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011, pp. 23–51.
- [270] F. Bühling, N. Waldburg, A. Reisenauer, A. Heimbürg, H. Golpon, T. Welte, Lysosomal cysteine proteases in the lung: role in protein processing and immunoregulation, *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* 23 (2004) 620–628.
- [271] H.A. Chapman, J.S. Munger, G.P. Shi, The role of thiol proteases in tissue injury and remodeling, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150 (1994) S155–S159.
- [272] H.A. Chapman, R.J. Riese, G.P. Shi, Emerging roles for cysteine proteases in human biology, *Annu. Rev. Physiol.* 59 (1997) 63–88.
- [273] F. Lecaillon, D. Brömme, G. Lalmanach, Biochemical properties and regulation of cathepsin K activity, *Biochimie* 90 (2008) 208–226.
- [274] F. Bühling, A. Gerber, C. Häckel, S. Krüger, T. Köhnlein, D. Brömme, D. Reinhold, S. Ansorge, T. Welte, Expression of cathepsin K in lung epithelial cells, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20 (1999) 612–619.
- [275] G. Lalmanach, A. Saidi, S. Marchand-Adam, F. Lecaillon, M. Kasabova, Cysteine cathepsins and cystatins: from ancillary tasks to prominent status in lung diseases, *Biol. Chem.* 396 (2015).
- [276] K.D. Bhoola, C.D. Figueroa, K. Worthy, Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases, *Pharmacol. Rev.* 44 (1992) 1–80.
- [277] A.H. Schmaier, R. Wahl, S.J. Fisher, D. Brenner, The pharmacokinetics of the kininogens, *Thromb. Res.* 92 (1998) 293–297.
- [278] Z.T. Barry, M.O. Platt, Cathepsin S cannibalism of cathepsin K as a mechanism to reduce type I collagen degradation, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 27723–27730.
- [279] H. Takahashi, K. Ishidoh, D. Muno, A. Ohwada, T. Nukiwa, E. Kominami, S. Kira, Cathepsin L activity is increased in alveolar macrophages and bronchoalveolar lavage fluid of smokers, *Am. Rev. Respir. Dis.* 147 (1993) 1562–1568.
- [280] M. Srivastava, K. Steinwede, R. Kiviranta, J. Morko, H.-G. Hoymann, F. Langer, F. Bühling, T. Welte, U. Maus, Overexpression of cathepsin K in mice decreases collagen deposition and lung resistance in response to bleomycin-induced pulmonary fibrosis, *Respir. Res.* 9 (2008) 54.
- [281] F. Veillard, F. Lecaillon, G. Lalmanach, Lung cysteine cathepsins: intruders or unorthodox contributors to the kallikrein-kinin system? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40 (2008) 1079–1094.
- [282] M. Kasabova, A. Saidi, C. Naudin, J. Sage, F. Lecaillon, G. Lalmanach, Cysteine cathepsins: markers and therapy targets in lung disorders, *Clin. Rev. Bone Min. Metab.* 9 (2011) 148–161.
- [283] J.C. Chang, M. Lesser, O.H. Yoo, M. Orlowski, Increased cathepsin B-like activity in alveolar macrophages and bronchoalveolar lavage fluid from smokers, *Am. Rev. Respir. Dis.* 134 (1986) 538–541.
- [284] R.A. Stockley, Biomarkers in chronic obstructive pulmonary disease: confusing or useful? *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* 9 (2014) 163–177.
- [285] M. Abrahamson, R.W. Mason, H. Hansson, D.J. Buttle, A. Grubb, K. Ohlsson, Human cystatin C, role of the N-terminal segment in the inhibition of human cysteine proteinases and in its inactivation by leucocyte elastase, *Biochem. J.* 273 (Pt 3) (1991) 621–626.
- [286] K. Takeyabu, T. Betsuyaku, M. Nishimura, A. Yoshioka, M. Tanino, K. Miyamoto, Y. Kawakami, Cysteine proteinases and cystatin C in bronchoalveolar lavage fluid from subjects with subclinical emphysema, *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* 12 (1998) 1033–1039.
- [287] P. Golovatch, B.A. Mercer, V. Lemaître, A. Wallace, R.F. Foronjy, J. D'Armiento, Role for cathepsin K in emphysema in smoke-exposed guinea pigs, *Exp. Lung Res.* 35 (2009) 631–645.
- [288] Z. Wang, T. Zheng, Z. Zhu, R.J. Homer, R.J. Riese, H.A. Chapman, S.D. Shapiro, J.A. Elias, Interferon gamma induction of pulmonary emphysema in the adult murine lung, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 1587–1600.
- [289] T. Zheng, Z. Zhu, Z. Wang, R.J. Homer, B. Ma, R.J. Riese, H.A. Chapman, S.D. Shapiro, J.A. Elias, Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema, *J. Clin. Invest.* 106 (2000) 1081–1093.
- [290] P. Geraghty, M.P. Rogan, C.M. Greene, M.L. Brantly, S.J. O'Neill, C.C. Taggart, N.G. McElvaney, Alpha-1-antitrypsin aerosolised augmentation abrogates neutrophil elastase-induced expression of cathepsin B and matrix metalloproteinase 2 in vivo and in vitro, *Thorax* 63 (2008) 621–626.
- [291] P. Geraghty, C.M. Greene, M. O'Mahony, S.J. O'Neill, C.C. Taggart, N.G. McElvaney, Secretory leucocyte protease inhibitor inhibits interferon-gamma-induced cathepsin S expression, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 33389–33395.
- [292] M.-J. Kang, R.J. Homer, A. Gallo, C.G. Lee, K.A. Crothers, S.J. Cho, C. Rochester, H. Cain, G. Chupp, H.J. Yoon, J.A. Elias, 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.* 178 (2007) 1948–1959.
- [293] A.S. Williams, P.R. Eynott, S.-Y. Leung, P. Nath, R. Jupp, G.T. De Sanctis, R. Resnick, I.M. Adcock, K.F. Chung, Role of cathepsin S in ozone-induced airway hyperresponsiveness and inflammation, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 22 (2009) 27–32.
- [294] H.K. Rokadia, S. Agarwal, Serum cystatin C and emphysema: results from the National health and nutrition examination survey (NHANES), *Lung* 190 (2012) 283–290.
- [295] Y. Zhang, Y. Zhu, Y. Wu, G. Wang, X. Xie, R. Ke, S. Li, L. Liu, W. Fen, F. Li, F. Li, M. Li, Serum cystatin C as a potential biomarker for the evaluation COPD, *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7 (2014) 5484–5490.
- [296] C.C. Taggart, C.M. Greene, S.G. Smith, R.L. Levine, P.B. McCray, S. O'Neill, N.G. McElvaney, Inactivation of human β -defensins 2 and 3 by elastolytic cathepsins, *J. Immunol.* 171 (2003) 931–937.
- [297] S.L. Martin, K.L. Moffitt, A. McDowell, C. Greenan, R.J. Bright-Thomas, A.M. Jones, A.K. Webb, J.S. Elborn, Association of airway cathepsin B and S with inflammation in cystic fibrosis, *Pediatr. Pulmonol.* 45 (2010) 860–868.
- [298] C. Naudin, A. Joulin-Giet, G. Couetdic, P. Plésiat, A. Szymanska, E. Gorna, F. Gauthier, F. Kasprzykowski, F. Lecaillon, G. Lalmanach, Human cysteine cathepsins are not reliable markers of infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis, *PLoS ONE* 6 (2011) e25577.
- [299] S. Weldon, P. McNally, D.F. McAuley, I.K. Olesby, C.L. Wohlford-Lenane, J.A. Bartlett, C.J. Scott, N.G. McElvaney, C.M. Greene, P.B. McCray, C.C. Taggart, miR-31 dysregulation in cystic fibrosis airways contributes to increased pulmonary cathepsin S production, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 190 (2014) 165–174.
- [300] M.P. Rogan, C.C. Taggart, C.M. Greene, P.G. Murphy, S.J. O'Neill, N.G. McElvaney, Loss of microbicidal activity and increased formation of biofilm due to decreased lactoferrin activity in patients with cystic fibrosis, *J. Infect. Dis.* 190 (2004) 1245–1253.
- [301] F. Lecaillon, C. Naudin, J. Sage, A. Joulin-Giet, A. Courty, P.-M. Andraut, R.A.W. Veldhuizen, F. Possmayer, G. Lalmanach, Specific cleavage of the lung surfactant protein A by human cathepsin S may impair its antibacterial properties, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45 (2013) 1701–1709.
- [302] P.-M. Andraut, S.A. Samsonov, G. Weber, L. Coquet, K. Nazmi, J.G.M. Bolscher, A.-C. Lalmanach, T. Jouenne, D. Brömme, M.T. Pisabarro, G. Lalmanach, F. Lecaillon, Antimicrobial Peptide LL-37 is both a substrate of cathepsins S and K and a selective inhibitor of cathepsin L, *Biochemistry* 54 (2015) 2785–2798.
- [303] F. Bräsch, A. Ten Brinke, G. Johnen, M. Ochs, N. Kapp, K.M. Müller, M.F. Beers, H. Fehrenbach, J. Richter, J.J. Batenburg, F. Bühling, Involvement of cathepsin H in the processing of the hydrophobic surfactant-associated protein C in type II pneumocytes, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26 (2002) 659–670.
- [304] F. Bühling, M. Kouadio, C.E. Chwieralski, U. Kern, J.M. Hohlfeld, N. Klemm, N. Friedrichs, W. Roth, J.M. Deussing, C. Peters, T. Reinheckel, Gene targeting of the cysteine peptidase cathepsin H impairs lung surfactant in mice, *PLoS One* 6 (2011) e26247.
- [305] C. Naudin, F. Lecaillon, S. Chowdhury, J.C. Krupa, E. Purisima, J.S. Mort, G. Lalmanach, The occluding loop of cathepsin B prevents its effective inhibition by human kininogens, *J. Mol. Biol.* 400 (2010) 1022–1035.
- [306] E. Godat, V. Hervé-Grépinet, F. Veillard, F. Lecaillon, M. Belghazi, D. Brömme, G. Lalmanach, Regulation of cathepsin K activity by hydrogen peroxide, *Biol. Chem.* 389 (2008) 1123–1126.
- [307] V. Hervé-Grépinet, F. Veillard, E. Godat, N. Heuzé-Vourc'h, F. Lecaillon, G. Lalmanach, Extracellular catalase activity protects cysteine cathepsins from inactivation by hydrogen peroxide, *FEBS Lett.* 582 (2008) 1307–1312.
- [308] C.A. Owen, Proteinases and oxidants as targets in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease, *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2 (2005) 373–385 discussion 394–395.
- [309] G.T. Layton, S.J. Harris, F.A. Bland, S.R. Lee, S. Fearn, J. Kaleta, M.L. Wood, A. Bond, G. Ward, Therapeutic effects of cysteine protease inhibition in allergic lung inflammation: inhibition of allergen-specific T lymphocyte migration, *Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al* 50 (2001) 400–408.
- [310] D. Small, R. Burden, C. Scott, The emerging relevance of the cysteine protease cathepsin S in disease, *Clin. Rev. Bone Min. Metab.* 9 (2011) 122–132.
- [311] R.J. Riese, R.N. Mitchell, J.A. Villadangos, G.P. Shi, J.T. Palmer, E.R. Karp, G.T. De Sanctis, H.L. Ploegh, H.A. Chapman, Cathepsin S activity regulates antigen presentation and immunity, *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 2351–2363.
- [312] K. Deschamps, W. Cromlish, S. Weicker, S. Lamontagne, S.L. Huszar, J.Y. Gauthier, J.S. Mudgett, A. Guimond, R. Romand, N. Frossard, M.D. Percival, D. Slipetz, C.M. Tan, Genetic and pharmacological evaluation of cathepsin S in a mouse model of asthma, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 45 (2011) 81–87.
- [313] O. Vasiljeva, T. Reinheckel, C. Peters, D. Turk, V. Turk, B. Turk, Emerging roles of cysteine cathepsins in disease and their potential as drug targets, *Curr. Pharm. Des.* 13 (2007) 387–403.
- [314] J.R. Somoza, J.T. Palmer, J.D. Ho, The crystal structure of human cathepsin F and its implications for the development of novel immunomodulators, *J. Mol. Biol.* 322 (2002) 559–568.
- [315] A. Faiz, G. Tjin, L. Harkness, M. Weckmann, S. Bao, J.L. Black, B.G.G. Oliver, J.K. Burgess, The expression and activity of cathepsins D, H and K in asthmatic airways, *PLoS One* 8 (2013) e57245.
- [316] C. Perdereau, E. Godat, M.-C. Maurel, E. Hazouard, E. Diot, G. Lalmanach, Cysteine cathepsins in human silicotic bronchoalveolar lavage fluids, *Biochim. Biophys. Acta* 1762 (2006) 351–356.
- [317] C. Serveau-Avesque, M.F.-D. Martino, V. Hervé-Grépinet, E. Hazouard, F. Gauthier, E. Diot, G. Lalmanach, Active cathepsins B, H, K, L and S in human inflammatory bronchoalveolar lavage fluids, *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol.*

- Organ 98 (2006) 15–22.
- [318] G. Lalmanach, E. Diot, E. Godat, F. Lecaille, V. Hervé-Grépinet, Cysteine cathepsins and caspases in silicosis, *Biol. Chem.* 387 (2006) 863–870.
- [319] D.F. Liao, N.X. Yin, J. Huang, S.F. Ryan, Effects of human polymorphonuclear leukocyte elastase upon surfactant proteins in vitro, *Biochim. Biophys. Acta* 1302 (1996) 117–128.
- [320] S.F. Ryan, Y. Ghassibi, D.F. Liao, Effects of activated polymorphonuclear leukocytes upon pulmonary surfactant in vitro, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 4 (1991) 33–41.
- [321] W.I. Mariencheck, J. Savov, Q. Dong, M.J. Tino, J.R. Wright, Surfactant protein A enhances alveolar macrophage phagocytosis of a live, mucoid strain of *P. aeruginosa*, *Am. J. Physiol.* 277 (1999) L777–L786.
- [322] T. Kantyka, K. Pyrc, M. Gruca, J. Smagur, K. Plaza, K. Guzik, S. Zeglen, M. Ochman, J. Potempa, *Staphylococcus aureus* proteases degrade lung surfactant protein A potentially impairing innate immunity of the lung, *J. Innate Immun.* 5 (2013) 251–260.
- [323] M. Griesse, A. Wiesener, F. Lottspeich, C. von Bredow, Limited proteolysis of surfactant protein D causes a loss of its calcium-dependent lectin functions, *Biochim. Biophys. Acta* 1638 (2003) 157–163.
- [324] P.E. Bratcher, N.M. Weathington, H.J. Nick, P.L. Jackson, R.J. Snelgrove, A. Gaggar, MMP-9 cleaves SP-D and abrogates its innate immune functions in vitro, *PLoS One* 7 (2012) e41881.
- [325] S.J. Gardai, Y.-Q. Xiao, M. Dickinson, J.A. Nick, D.R. Voelker, K.E. Greene, P.M. Henson, By binding SIRPalpha or calreticulin/CD91, lung collectins act as dual function surveillance molecules to suppress or enhance inflammation, *Cell* 115 (2003) 13–23.
- [326] J. Cooley, B. McDonald, F.J. Accurso, E.C. Crouch, E. Remold-O'Donnell, Patterns of neutrophil serine protease-dependent cleavage of surfactant protein D in inflammatory lung disease, *J. Leukoc. Biol.* 83 (2008) 946–955.
- [327] M.L. Ruano, I. García-Verdugo, E. Miguel, J. Pérez-Gil, C. Casals, Self-aggregation of surfactant protein A, *Biochemistry* 39 (2000) 6529–6537.
- [328] M. Zanetti, R. Gennaro, D. Romeo, Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain, *FEBS Lett.* 374 (1995) 1–5.
- [329] A. Schmidtchen, I.-M. Frick, E. Andersson, H. Tapper, L. Björck, Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37, *Mol. Microbiol.* 46 (2002) 157–168.
- [330] J. Koziel, A.Y. Karim, K. Przybyszewska, M. Ksiazek, M. Rapala-Kozik, K.-A. Nguyen, J. Potempa, Proteolytic inactivation of LL-37 by karilysin, a novel virulence mechanism of *Tannerella forsythia*, *J. Innate Immun.* 2 (2010) 288–293.
- [331] M. Sieprawska-Lupa, P. Mydel, K. Krawczyk, K. Wójcik, M. Puklo, B. Lupa, P. Suder, J. Silberring, M. Reed, J. Pohl, W. Shafer, F. McAleese, T. Foster, J. Travis, J. Potempa, Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 4673–4679.
- [332] K. Yamasaki, J. Schaubert, A. Coda, H. Lin, R.A. Dorschner, N.M. Schechter, C. Bonnart, P. Descargues, A. Hovnanian, R.L. Gallo, Kallikrein-mediated proteolysis regulates the antimicrobial effects of cathelicidins in skin, *FASEB J.* 20 (2006) 2068–2080.
- [333] J. Singh, A. Naran, N.L. Misso, P.J. Rigby, P.J. Thompson, K.D. Bhoola, Expression of kallikrein-related peptidases (KRP/hK5, 7, 6, 8) in subtypes of human lung carcinoma, *Int. Immunopharmacol.* 8 (2008) 300–306.
- [334] C. Planque, M. de Monte, S. Guyétant, J. Rollin, C. Desmazes, V. Panel, E. Lemarié, Y. Courty, KLK5 and KLK7, two members of the human tissue kallikrein family, are differentially expressed in lung cancer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329 (2005) 1260–1266.
- [335] S.G. Tjabringa, K.F. Rabe, P.S. Hiemstra, The human cathelicidin LL-37: a multifunctional peptide involved in infection and inflammation in the lung, *Pulm. Pharmacol. Ther.* 18 (2005) 321–327.
- [336] K. Masuda, T. Suga, A. Takeuchi, M. Kanesaki, A. Imaizumi, Y. Suzuki, Specific cleavage of secretory leukoprotease inhibitor by neutrophil elastase and saliva, *Biochem. Pharmacol.* 48 (1994) 651–657.
- [337] A.R. Kocuzulla, R. Bals, Antimicrobial peptides: current status and therapeutic potential, *Drugs* 63 (2003) 389–406.
- [338] F. Seiler, P.M. Lepper, R. Bals, C. Beisswenger, Regulation and function of antimicrobial peptides in immunity and diseases of the lung, *Protein Pept. Lett.* 21 (2014) 341–351.
- [339] B.E. Oyinloye, A.F. Adenowo, A.P. Kappo, Reactive oxygen species, apoptosis, antimicrobial peptides and human inflammatory diseases, *Pharm. Basel Switz.* 8 (2015) 151–175.
- [340] T. Moreau, K. Baranger, S. Dadé, S. Dallet-Choisy, N. Guyot, M.-L. Zani, Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family, *Biochimie* 90 (2008) 284–295.
- [341] A. Mihaila, G.M. Tremblay, Human alveolar macrophages express elafin and secretory leukocyte protease inhibitor, *Z. Für Naturforsch. C J. Biosci.* 56 (2001) 291–297.
- [342] T.B. McNeely, M. Dealy, D.J. Dripps, J.M. Orenstein, S.P. Eisenberg, S.M. Wahl, Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro, *J. Clin. Invest.* 96 (1995) 456–464.
- [343] S.P. Eisenberg, K.K. Hale, P. Heimdal, R.C. Thompson, Location of the protease-inhibitory region of secretory leukocyte protease inhibitor, *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 7976–7981.
- [344] A.J. Simpson, A.I. Maxwell, J.R. Govan, C. Haslett, J.M. Sallenave, Elafin (elastase-specific inhibitor) has anti-microbial activity against gram-positive and gram-negative respiratory pathogens, *FEBS Lett.* 452 (1999) 309–313.
- [345] H. Gusman, J. Travis, E.J. Helmerhorst, J. Potempa, R.F. Troxler, F.G. Oppenheim, Salivary histatin 5 is an inhibitor of both host and bacterial enzymes implicated in periodontal disease, *Infect. Immun.* 69 (2001) 1402–1408.
- [346] H. Gusman, U. Lendenmann, J. Grogan, R.F. Troxler, F.G. Oppenheim, Is salivary histatin 5 a metalloproteinase? *Biochim. Biophys. Acta* 1545 (2001) 86–95.
- [347] S. Zhu, L. Wei, K. Yamasaki, R.L. Gallo, Activation of cathepsin L by the cathelin-like domain of proteoglycan-3, *Mol. Immunol.* 45 (2008) 2531–2536.
- [348] M. Pazgier, B. Ericksen, M. Ling, E. Toth, J. Shi, X. Li, A. Galliher-Beckley, L. Lan, G. Zou, C. Zhan, W. Yuan, E. Pozharski, W. Lu, Structural and functional analysis of the pro-domain of human cathelicidin, LL-37, *Biochemistry* 52 (2013) 1547–1558.

Annexe 2

Specific cleavage of the lung surfactant protein A by human cathepsin S may impair its antibacterial properties

F. Lecaille, C. Naudin, Sage, A. Joulin-Giet, A. Courty, P.M. Andrault, R.A.W. Veldhuizen, F. Possmayer & G. Lalmanach (2013)

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 45: 1701–1709.



Specific cleavage of the lung surfactant protein A by human cathepsin S may impair its antibacterial properties



Fabien Lecaille^{a,b,1}, Clément Naudin^{a,b,2,1}, Juliette Sage^{a,b,3}, Alix Joulin-Giet^{a,b},
Agnès Courty^{a,b}, Pierre-Marie Andrault^{a,b}, Ruud A.W. Veldhuizen^{c,d},
Fred Possmayer^{e,f}, Gilles Lalmanach^{a,b,*}

^a Université François Rabelais, Tours, France

^b INSERM, UMR 1100 «Pathologies Pulmonaires: Protéolyse et Aérosolthérapie», Equipe «Mécanismes protéolytiques dans l'inflammation» - Centre d'Etude des Pathologies Respiratoires (CEPR), Tours, France

^c University of Western Ontario, Lawson Health Research Institute, Department of Medicine, London, Ontario, Canada

^d University of Western Ontario, Lawson Health Research Institute, Department of Physiology and Pharmacology, London, Ontario, Canada

^e University of Western Ontario, Department of Obstetrics & Gynecology, London, Ontario, Canada

^f University of Western Ontario, Department of Biochemistry, London, Ontario, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 March 2013

Received in revised form 7 May 2013

Accepted 14 May 2013

Available online 22 May 2013

Keywords:

Antimicrobial protein

Cysteine protease

Collectin

Cystic fibrosis

Lung

SP-A

Proteolysis

ABSTRACT

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. Breakdown of SP-A was markedly decreased in CF sputum by E-64 and Mu-Leu-Hph-VSPH, a Cat S inhibitor. 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 human neutrophil serine proteases and bacterial proteases, we propose that Cat S may participate in the pathophysiology of CF by weakening the antibacterial activity of SP-A. More broadly, present results provide further indication that Cat S, along with Cats B and L, could display immuno-modulatory functions by inactivating key proteins involved in the innate immunity defense.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Abbreviations: Abz, ortho-aminobenzoic acid; AEBSF, 4-(2-aminoethyl) benzenesulfonyl fluoride hydrochloride; AMC, 7-amino-4-methyl coumarin; BALF, broncho-alveolar lavage fluid; BCA, bicinchoninic acid; CA-074, N-(1-3-trans-propylcarbonyloxirane-2-carbonyl)-L-isoleucyl-L-proline; 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; FRET, fluorescence resonance energy transfer; HNE, human neutrophil elastase; 3-NO₂-Tyr, 3-nitro-tyrosine; MMTs, methylmethanethiosulfonate; Mu-Leu-Hph-VSPH, morpholine urea-leucyl-homophenylalanyl-(vinylsulfonyl)benzene; NSP, neutrophil serine protease; PMA, phorbol 12-myristate 13-acetate; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; Ps+, *Pseudomonas aeruginosa*-positive; Ps-, *P. aeruginosa*-negative; RT, room temperature; SP-A, surfactant protein A; TBS, tris buffer saline; Z, benzyloxycarbonyl.

* Corresponding author at: 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 address: gilles.lalmanach@univ-tours.fr (G. Lalmanach).

¹ Equal contribution to the work.

² Current address: Lund University, Department of Clinical Sciences, Division of Infection Medicine, Biomedical Center (BMC), Lund, Sweden.

³ Current address: Université François Rabelais, INSERM, UMR 1100, Tours, France; LVMH-Recherche (Louis Vuitton-Moët Hennessy), Département Sciences du Vivant, Saint Jean de Braye, France.

1. Introduction

Among the clinical manifestations observed in cystic fibrosis, chronic inflammation of the respiratory epithelium results 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, is of therapeutic importance. Although rodent models have contributed to our understanding, a stringent limitation to evaluate how proteases act in humans is that there is no satisfactory CF mouse model (for review: [Guilbault et al., 2007](#)), thus requiring the development of valuable alternative models but still cumbersome to manage such as porcine model ([Br  a et al., 2012](#)). Human cysteine cathepsins (eleven members: cathepsins B, H, L, S, C, K, O, F, V, X and W) that display potent collagenolytic and elastinolytic activities have emerged yet as new players in inflammatory lung disorders and in pulmonary homeostasis ([Kasabova et al., 2011](#); [Wolters and Chapman, 2000](#)). Apart from their participation in the lysosomal degradation ([Turk et al., 2012a,b](#)), cathepsins (Cats) are also involved in alternative cellular pathways and may locate in nuclei and as extracellular (soluble or cell surface-associated) molecular forms ([Brix et al., 2008](#)). 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, inflammation) ([Lecaille et al., 2002](#); [Reiser et al., 2010](#)). While no measurable or low Cat levels are detected in sputum (expectorations) of healthy people, their activities are dramatically increased in the sputum of CF patients, suggesting that Cats are involved in the pathophysiology of CF and are valuable markers of inflammation ([Taggart et al., 2003](#); [Voynow et al., 2008](#)). Both expressions of Cat B and Cat S are correlated with that of IL-8 in CF sputum ([Martin et al., 2010](#)). Also, the acid pH (below 6.0) of the epithelium lining fluid in CF provides optimal conditions for Cats activity ([Tate et al., 2002](#)). 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 found in CF expectorations ([Naudin et al., 2011](#)). The cathepsins/cathepsin inhibitors imbalance remains unchanged and similar (~2-fold) in both *P. aeruginosa*-positive (*Ps*+) and *P. aeruginosa*-negative (*Ps*-) expectorations. 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 HNE, which indicate that Cats are not biomarkers of infection by *P. aeruginosa* ([Naudin et al., 2011](#)). 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 CF ([Rogan et al., 2004](#); [Taggart et al., 2001, 2003](#)).

Lung epithelium assures gas-exchange in the alveoli and protects from pathogens and pollutants. 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. Alteration or deficiency of surfactant is 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. It has been shown that Cat H is implicated in the maturation and secretion of SP-B ([Buhling et al., 2011](#)). Both SP-A and SP-D that are produced by alveolar type II epithelial

cells and by Clara cells are fundamental components of the innate immunity showing protective roles against bacteria, fungi, and respiratory viruses ([Crouch and Wright, 2001](#)). Their deficiency or modification due to both proteolytic damages and oxidations (nitration and hydroxylation) has been associated to lung infections and exacerbation of the inflammatory response ([von Bredow et al., 2001](#)). Analysis of CF bronchoalveolar fluids showed that a decrease of intact surfactant proteins is associated to the lack of agglutination of *P. aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* ([Griese et al., 2003](#)). SP-A is a collectin that consists of a 34 kDa monomer that may form a "bouquet of tulips"-like structure (octadecamer) ([Haagsman and Diemel, 2001](#)); each monomer possesses a N-terminal collagen-like domain linked by a neck region to a Ca²⁺-dependent carbohydrate recognition domain (e.g. C-type lectin) mediating the clearance of pathogens and modulating some immune cell functions ([Gupta and Suroli  , 2007](#); [Haagsman et al., 2008](#)). HNE as well proteases from *P. aeruginosa* are involved in the breakdown and/or the inactivation of SP-A ([Beatty et al., 2005](#); [Mariencheck et al., 2003](#); [Rubio et al., 2004](#)). Alternatively alveolar macrophages could contribute to the catabolism of SP-A in the lung ([Bates and Fisher, 1996](#)), and a pronounced increase in SP-A degradation was observed upon PMA stimulation ([Bates et al., 1997](#)). Given that differentiated macrophages overexpress and secrete Cats in response to PMA ([Reddy et al., 1995](#); [Veillard et al., 2008](#)), data suggest that in addition to bacterial proteases and host NSPs, Cats may be also involved in SP-A catabolism. Such statements and a growing body of evidence that Cats may abrogate the microbicidal activity of defensins, lactoferrin, and secretory leukocyte protease inhibitor (see: [Quinn et al., 2010](#); [Rogan et al., 2004](#); [Taggart et al., 2001, 2003](#)) prompted us to investigate if Cats could participate in SP-A degradation in CF patients and thus impair its antibacterial properties.

2. Materials and methods

2.1. Enzymes, synthetic substrates and inhibitors

Human Cats B, L, H and S came from Calbiochem (VWR International S.A.S., Libourne, France) and bovine Cat C was from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Human Cat K was kindly provided by Prof. D. Brömme (University of British Columbia, Vancouver, Canada). Pepstatin A, MMTS, E-64, PMSF, and AEBSF were obtained from Sigma-Aldrich. CA-074 was from Calbiochem. Mu-Leu-Hph-VSPh was kindly provided by Prof. J.H. McKerrow (University of California, San Francisco, CA, USA). DTT, 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.

2.2. 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). Briefly, following the addition of a preservative buffer (0.1 M sodium acetate, pH 5.0, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM EDTA, 40 µM pepstatin A, and 1 mM MMTS), specimens were immediately handled, centrifuged at 5000 × g at 4 °C for 10 min before supernatants were frozen and stored at -80 °C until used as previously detailed ([Naudin et al., 2011](#)). Following isolation from whole lung lavage obtained from an alveolar proteinosis patient using butanol extraction and purification ([Bailey et al., 2006](#)), human SP-A (3 mg/ml) was stored at -20 °C. Rabbit anti SP-A antibody is a kind gift from Dr Henk Haagsman (Utrecht University, Netherlands).

Protein concentration was determined using BCA assay (Interchim, Montluçon, France) and alternatively the Bradford protein assay (Bio-Rad France, Marnes-la-Coquette). Prof. Agnes Rosenau (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).

2.3. Immunodetection of SP-A in CF sputum

Supernatants of CF sputum (standardized amount: 30 µg protein/sample) 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 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 prior to detection (ECL Plus Western Blotting Detection system, Amersham Biosciences). Purified SP-A (150 ng) was treated under the same conditions as control.

2.4. 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 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5, 0.01% Brij35 and 4 mM DTT (0–8 h) in the presence 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 SDS-PAGE (15%) under reducing conditions, then immunoblotted as described above using an anti-SP-A antibody.

2.5. Degradation of SP-A by Cats

Purified SP-A (3 µg) was incubated with increasing concentrations of Cats 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 15% SDS-PAGE (reducing 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 (Linke et al., 2006). 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, then transferred onto polyvinylidene fluoride membrane (Prosorb inserts, Applied Biosystems, France). Coomassie Brilliant Blue R250-stained strips were excised and analyzed by the Edman method (Procise 491 sequencer, Applied Biosystems).

2.6. Kinetics measurement

Fmoc-protected L-amino acids were purchased from NeoMPS (Strasbourg, France) and Advanced Chemtech (Cambridge, GB). The FRET substrate, Abz-NWYRGEPA-(3-NO₂-Tyr) that corresponds to residues Asn190 to Ala197 within the CRD domain of SP-A, flanked by a fluorescence donor group (Abz) and a quencher group (3-NO₂-Tyr), was prepared by standard Fmoc solid phase peptide synthesis (Lecaille et al., 2003). 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) (Veillard et al., 2011).

2.7. Molecular modeling of human SP-A

According to the crystal structure of full monomeric human SP-A (~34 kDa) was not available, we built three-dimensional models for CRD and neck domains of human SP-A. Human SP-A (accession number Q8IWL2, Protein Knowledgebase, UniProtKB) was aligned with rat SP-A (PDB 1R14) that served as a template protein 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 (software 3D-JIGSAW version 2.0; <http://bmm.cancerresearchuk.org/~3djigsaw/>). One homology-based human SP-A model displayed similar overall structure features to the rat SP-A. The root-mean-square deviation (RMSD) between the two structures was 0.639 Å, after superimposing 145 Cα atoms. Sequence alignment of both domains (CRD and neck) between rat and human exhibited 80% of homology and 68% of identity. Percentage of secondary-structure matching was 98 and the Bit-score (corresponding to empirical accuracy of the alignment) was 4.48 with an E-value of 7e-40. The programs ProQ and ProQres were used to evaluate the quality of the predicted model. The LG score was 2.52 and the MaxSub score was 0.262.

2.8. Binding of 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 (Maxisorp Immunoplate, Nunc A/S, Roskilde, Denmark) previously coated by mannan from *S. cerevisiae* (100 ng/well, Sigma-Aldrich) 2 h at RT. After incubation with the 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 1:10,000) 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 median (+/− extreme) values reported.

2.9. 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, w/w) 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 (3 mg/ml) 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 s 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).

2.9.1. Self-aggregation of SP-A

SP-A (3 μ g) 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 μ l), before adding E-64 (5 μ M). 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 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 (spectrophotometer Varian Cary 100 Scan, Varian Medical Systems France, Buc) and analyzed using the software CARY WinUV kinetics.

2.9.2. Aggregation of lipid vesicles

SP-A (5 μ g) was incubated 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. Control was made in the presence of E-64-treated Cat S. DPPC/DPPG (60 μ g/ml) was further added to buffer B (final volume: 600 μ l) 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 μ g/ml), except that SP-A (12 μ g) was incubated with Cat S for 4 h. Competition experiments were performed in the presence of SP-A and mannan (10 mg/ml).

2.10. 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 $\times$ g, 10 min), washed 3 times and resuspended in PBS. The concentration was determined by measuring absorbance ($\text{Abs}_{595\text{nm}} = 0.1$ corresponding to 8×10^7 CFU/ml). Alternatively *E. coli* J5 strain was grown on LB agar, Lennox (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 $\times$ g, 10 min) and 3-times washing, bacteria were resuspended in PBS (7.5×10^9 CFU/ml).

2.10.1. *E. coli* agglutination

After incubation with Cat S (100 nM) or its E-64-inactivated form 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 μ g) 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 CFU/ml) (final volume: 600 μ l). 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 for both active Cat S and E-64-inactivated Cat S incubated with bacteria in the lack of SP-A. Separately agglutination tests were completed in tube with SP-A (30 μ g), and identical concentrations of Cat S (100 nM) and bacteria (2.5×10^8 CFU/ml; volume: 3 ml).

2.10.2. *P. aeruginosa* agglutination

SP-A (3 μ g) 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 CFU/ml; final volume: 200 μ l) 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. 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 $\times$). The Live/Dead BacLight bacterial viability Kit (Molecular Probes) was obtained from Invitrogen Life Technologies SAS (Saint Aubin, France). Briefly SP-A (3 μ g) was incubated alone or with Cat S (100 nM) in 0.1 M sodium acetate, pH 5.5, 2 mM DTT, 0.01% Brij35 at 37 °C for 1 h. Alternatively, experiments were performed by pre-incubation of Cat S with E-64. Reaction mixtures were added to log-phase *P. aeruginosa* (2×10^7 CFU/ml) and samples were incubated for 3 h at room temperature. Fluorescence of both membrane-permeable SYTO 9 fluorophore that labels live bacteria and membrane-impermeable propidium iodide was measured following manufacturer's instructions.

2.11. Statistical analysis

Statistical significance was assessed using the non-parametric two-ways Friedman test. A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. SP-A is degraded in CF sputum

In accordance with previous reports stating that there is a marked deficiency in SP-A in CF patients (Griese et al., 2004; Noah et al., 2003), we detected only cleaved SP-A in CF sputum supernatants (calibrated amount of proteins: 30 μ g/well) (Fig. 1A), but not both the ~65 kDa (dimeric) and the ~34 kDa (monomeric) forms that correspond to intact SP-A as found in BALFs from patients with infiltrative disorders (e.g. sarcoidosis and alveolar proteinosis) (Serveau-Avesque et al., 2006; F. Lecaille and G. Lalmanach, unpublished data). A major proteolytic fragment (~45 kDa) was observed in both (Ps+) and (Ps-) CF samples, which is similar to the SP-A fragment generated under in vitro conditions by *P. aeruginosa* protease IV or human NSPs (Griese et al., 2001; Rubio et al., 2004). Nevertheless besides protease IV and NSPs other proteases may also be implicated in such proteolytic process. The presence of a 45 kDa SP-A fragment in patients not infected with *P. aeruginosa* was already documented (Mariencheck et al., 2003), while *Dermatophagoides allergens* Der p1 and Der f1, which have a thiol-dependent activity, are also able to degrade SP-A (Deb et al., 2007). Taking into account these data the ability of human Cats 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, generating a ~45 kDa fragment that compared to that observed in clinical specimens (Fig. 1B, lane C) (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. 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 (Fig. 1C). Nevertheless as mentioned above (Section 2.2), CF clinical specimens were handled by direct addition of preservative buffer containing peptidase inhibitors in order to stabilize and protect cathepsins from inactivation (Serveau-Avesque et al., 2006; Naudin et al., 2011). Thus it could not be excluded that other classes of proteases besides Cat S might be involved in SP-A degradation in situ. Interestingly, as support for our hypothesis, preliminary immunohistochemical studies suggest that both Cat S

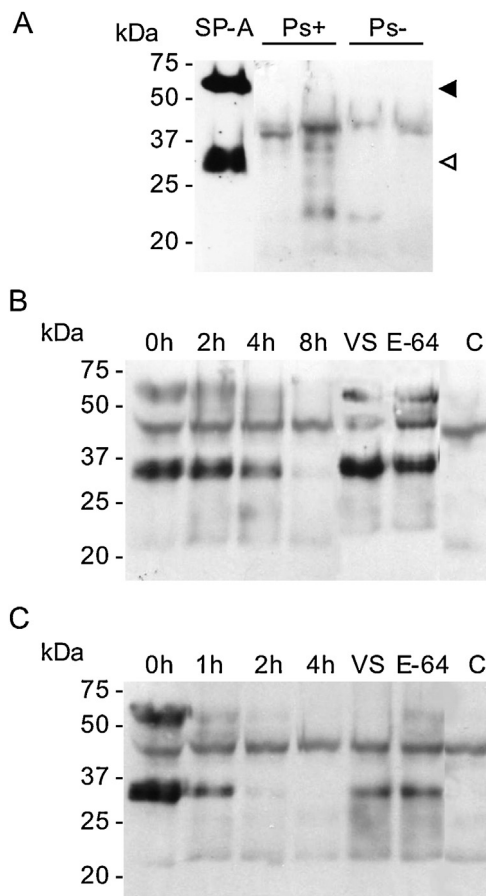


Fig. 1. SP-A is degraded in CF sputum and is susceptible to hydrolysis by sputum Cats. (A) Status of SP-A in cell-free CF supernatants isolated from sputum of *P. aeruginosa* positive (Ps+) or negative (Ps-) patients (representative samples). CF supernatants (corresponding to 30 µg protein) were analyzed 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. C, control CF expectoration. 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.

and SP-A antigens have a matching distribution in distal bronchial and bronchiolar/alveolar epithelia (data not shown).

3.2. Cat S cleaves SP-A within its functional lectin-like domain

Human purified SP-A was incubated with individual proteases. Only Cat S hydrolyzed efficiently SP-A compared to Cats L and K as quantified by densitometric analysis of monomeric SP-A (Fig. 2A), while Cats H, C and B did not. An identical result was obtained by densitometric analysis of the dimeric form. Furthermore the concentration-dependent degradation of SP-A by Cat S was more efficient at pH 7.4 (Fig. 2B and C) in accordance with former assays made using CF supernatants. Three (a major and two minor) cleavage sites were identified, all of them with a glycine residue at P1 (Fig. 3A). 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

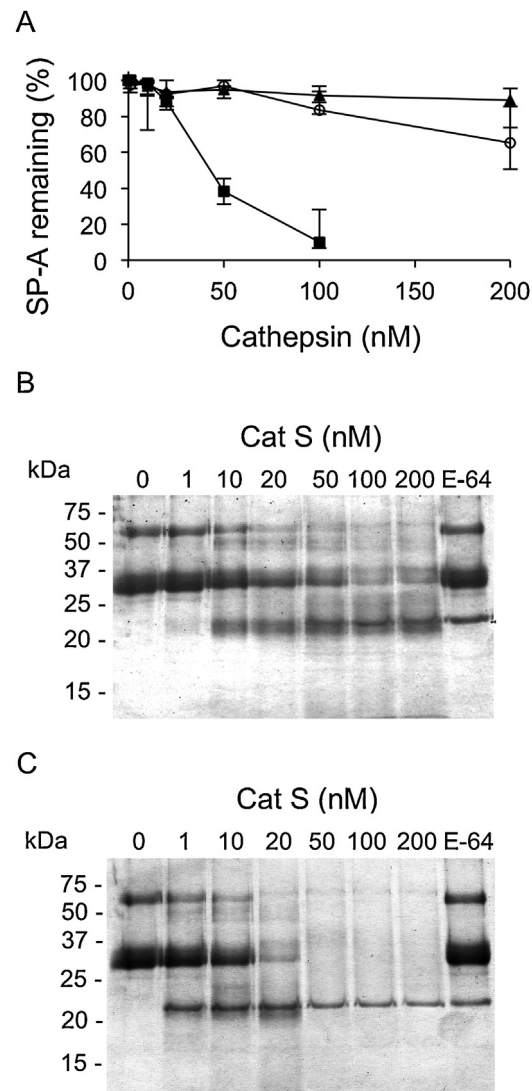


Fig. 2. Human SP-A is specifically cleaved by Cat S. (A) SP-A (3 µg) was incubated with increasing concentrations of purified Cat K (○), L (▲) and S (■) (0–200 nM) in 0.1 M sodium acetate, pH 5.5, 2 mM DTT, 0.01% Brij35, at 37 °C for 10 min. Results were quantified by densitometric analysis. Signal densities were measured using the NIH image software (Image J). Three independent experiments were averaged and expressed as the percentage of remaining SP-A (monomeric form). 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.

domain (Fig. 3B). 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 (Shang et al., 2011). Two residues, Glu195 and Glu202, together with residues Asn214 and Asp215 (Fig. 3C) are involved in a coordination bond with a calcium ion (Head et al., 2003). Moreover mutagenesis studies have shown that Glu202 and Arg197 are also essential for the binding of phospholipids and carbohydrates to rat recombinant SP-A (McCormack et al., 1997a,b). 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 (Fig. 4). Conversely oligosaccharide recognition is restored in the presence of E-64, supporting that Cat S may impair sugar-binding properties of the lectin domain, thus leading to the functional inactivation of SP-A, as observed for SP-D in the presence of HNE (Rubio et al., 2004). We designed a FRET peptidyl substrate, Abz-NWYRGEPA-(3-NO₂-Tyr), which corresponds to residues Asn190-Ala197 that flank either side of the

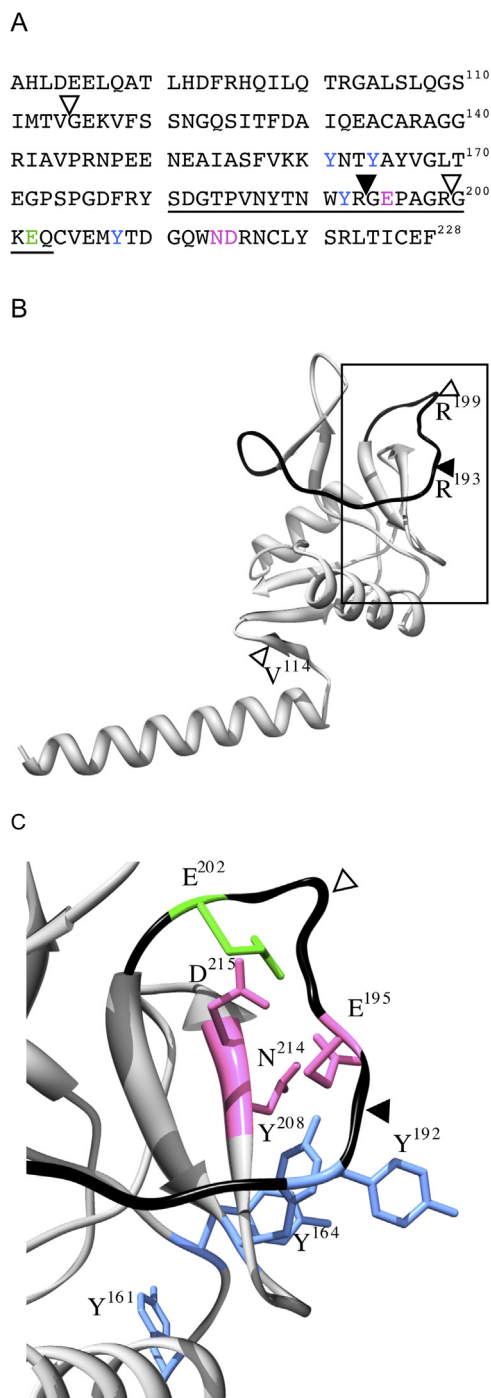


Fig. 3. Cat S cleaves human SP-A within its carbohydrate recognition domain (CRD). (A) Amino acids sequence of the coiled-coil neck region and the CRD (Met112–Phe228) (Swiss Prot access: Q8IWL2). Solvent exposed loop (Ser181–Gln203) of CRD is underlined. Blue labeling: residues implicated in phospholipids binding; pink labeling: amino acids implicated in carbohydrate recognition; Glu202 that is involved in both phospholipids and carbohydrate binding is colored in green. Cleavage sites were identified by N-terminal sequencing. 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 (Humphrey et al., 1996)). The structure of homology-based model of human SP-A was built as detailed in the experimental section (Section 2.7). (C) Residues involved in phospholipid and carbohydrate interactions are labeled: blue, phospholipids binding; pink, carbohydrate recognition; green (i.e. Glu202), both phospholipids and carbohydrate binding. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

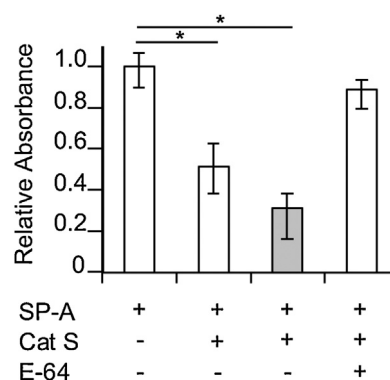


Fig. 4. Cleavage of SP-A by Cat S alters sugar binding. SP-A (3 µg) was incubated with Cat S (100 nM) in 0.1 M sodium acetate, pH 5.5 or 50 mM Tris–HCl, pH 7.5, 2 mM DTT, 0.01% Brij35, 2 mM CaCl₂ at 37 °C for 1 h. The samples were then transferred into mannan-coated wells, and the binding of SP-A to the sugar moiety was determined spectrophotometrically (450 nm). Bars (white bar, pH 5.5; gray bar, pH 7.4) correspond to median ± high/low values (n = 3). *P < 0.05, non-parametric Friedman test.

major cleavage site (i.e. Arg193–Gly194) within CRD. Second-order rate constants (k_{cat}/K_m) values were $2.42 \pm 0.4 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for Cat K, $58.5 \pm 9 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for Cat L and $764 \pm 15 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$ for Cat S at pH 5.5. Cat S but not Cats L and K still cleaved Abz-NWYRGEPA-(3-NO₂-Tyr) at a mild basic pH ($k_{\text{cat}}/K_m = 300 \pm 3.5 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$; pH 7.4) between Arg193 and Gly194. Conversely human NSPs, i.e. elastase ($k_{\text{cat}}/K_m = 1.96 \pm 0.2 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) and cathepsin G ($k_{\text{cat}}/K_m < 1 \text{ mM}^{-1} \text{ s}^{-1}$) 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.

3.3. Cat S impairs CRD-dependent aggregation properties of SP-A

We therefore examined the consequences of the Cat S-dependent degradation of SP-A on its capacity for self-aggregation and aggregation of phospholipids (DPPC/DPPG vesicles) since both DPPC and DPPG are the two major lipids of surfactant (~85% and ~11%, respectively) and are also critical for tensioactive properties (Garcia-Verdugo et al., 2010). Indeed in the presence of Cat S, SP-A lacked significantly its Ca²⁺-dependent ability to self-aggregate but also to aggregate phospholipid vesicles (Fig. 5A and B). Four hydrophobic tyrosyl residues (Tyr161, Tyr164, Tyr192, Tyr208) and also Glu202 within CRD were identified as essential for binding to DPPC-containing phospholipid vesicles (Casals et al., 1993; Ruano et al., 1998). Interestingly Tyr192 locates within the Ser181–Gln203 loop and 1-residue upstream of the prominent cleavage site (Arg193–Gly194 bond) for Cat S (Fig. 3C). Aggregation of phospholipids was 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. Moreover the lipid A moiety is thought to be a potent ligand of SP-A allowing aggregation of rough LPS (Rc-LPS), the major membrane component of Gram-negative bacteria (Van Iwaarden et al., 1994). Cat S-dependent cleavage of SP-A impaired aggregation of Rc-LPS vesicles; a similar withdrawal was observed in the presence of mannan competing with Rc-LPS (Fig. 5C). As reported above for DPPC/DPPG vesicles, inactivation of Cat S restored aggregation properties of SP-A toward LPS. Most probably, significant structural rearrangements of SP-A, especially within the highly flexible CRD loop, might occur once cleaved by Cat S at the Arg193–Gly194 bond in the vicinity of critical residues involved in ligand binding.

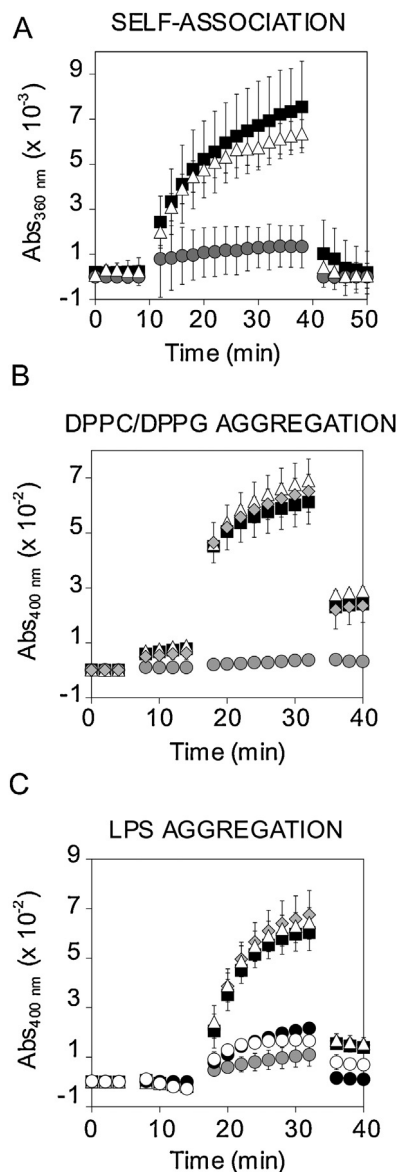


Fig. 5. Cat S impairs the Ca^{2+} -dependent aggregation properties of SP-A. (A) Self-aggregation. SP-A ($3 \mu\text{g}$) was incubated alone ($\blacksquare$) or with Cat S (100 nM) ($\bullet$) in 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.5, 4 mM GSH, 0.01% Brij35 (buffer A), for 1 h at 37°C (final volume: $20 \mu\text{l}$), before adding E-64 ($5 \mu\text{M}$). 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: $600 \mu\text{l}$). 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 ($5 \mu\text{g}$) was incubated alone ($\blacksquare$) or with Cat S (100 nM) ($\bullet$) in buffer A for 2 h at 37°C (final volume $20 \mu\text{l}$), then E-64 ($5 \mu\text{M}$) 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 ($60 \mu\text{g}/\text{ml}$) mixed to buffer B (final volume: $600 \mu\text{l}$) 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 Section 2. (C) Rc-LPS aggregation. A similar protocol was used for studying aggregation of Rc-LPS vesicles ($40 \mu\text{g}/\text{ml}$), except that SP-A ($12 \mu\text{g}$) was incubated with Cat S for 4 h . Additionally a competition experiment was performed in the presence of mannan ($10 \text{ mg}/\text{ml}$) ($\circ$). Control: self-aggregation of LPS ($\bullet$). A background absorbance signal that corresponds to self-aggregation of LPS was observed (Sanchez-Barbero et al., 2005). All data points are the mean values of experiments performed in triplicate $\pm \text{S.D.}$

Consistently it has been proposed that aggregation of phospholipids and LPS via lipid A as well CRD-dependent self-aggregation depend on the structural integrity of SP-A (Sanchez-Barbero et al., 2005).

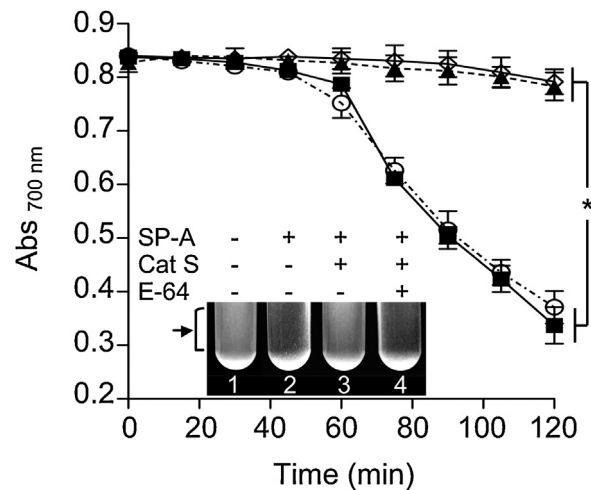


Fig. 6. Cleavage of SP-A by Cat S alters the agglutination of *E. coli*. SP-A ($6 \mu\text{g}$) was incubated alone ($\circ$) or with Cat S (100 nM) ($\blacktriangle$) for 1 h at 37°C in 0.1 M sodium acetate, pH 5.5, 2 mM DTT, 0.01% Brij35 (final volume: $600 \mu\text{l}$). Alternatively experiments were performed by pre-incubation of Cat S with E-64 ($\blacksquare$). Mixtures were added to log-phase *E. coli* ($2.5 \times 10^8 \text{ CFU}/\text{ml}$) in 25 mM HEPES buffer, pH 7.4, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM Ca^{2+} . Control: bacteria alone ($\diamond$). 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). Statistical significance was determined using the non-parametric Friedman test ($n=3$) ($*P<0.05$).

3.4. 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 the Ca^{2+} -dependent C-type CRD by binding of terminal monosaccharide residues characteristic of bacterial cell surfaces. Also the ability of SP-A to agglutinate the Gram-negative *E. coli* (J5 strain) was examined and the impact of degradation of SP-A by Cat S was evaluated. While for *E. coli* alone the absorbance at 700 nm remained stable (additionally see arrow: control test tube 1), intact SP-A agglutinated *E. coli* as evidenced by the decrease in absorbance due to the precipitation of bacteria (test tube 2); conversely presence of Cat S reduced prominently agglutination (test tube 3) (Fig. 6; $*P<0.05$). Addition of E-64 restored SP-A dependent bacterial agglutination (see test tube 4), confirming that the lack of binding properties depends on the proteolytic cleavage within the CRD loop. Moreover Cat S has no direct deleterious effects on bacteria since both active Cat S and E-64-inactivated Cat S incubated with *E. coli* (i.e. in the lack of SP-A) do not affect agglutination (data not show). Then we performed agglutination assays on *P. aeruginosa*, a foremost pathogen colonizing the lungs of CF patients and that is often the ultimate cause of death (May et al., 1991). Whereas intact SP-A agglutinated *P. aeruginosa*, there was no agglutination following incubation of SP-A with Cat S (Fig. 7A). Nevertheless a spontaneous decay of the signal was observed over time that corresponded to a faster bacterial deposition compared to that observed with *E. coli*. This led to less striking but significant variations between unbound and agglutinated *P. aeruginosa* ($n=3$, non-parametric Friedman test, $*P<0.05$). To overcome this experimental inconvenience supplemental assays were conducted to confirm our findings. Reactions were observed by optical microscopy (Fig. 7B, panel a) and stained with DAPI for fluorescence microscopy (end point) (Fig. 7B, panel b), allowing the direct and sensitive picturing of *P. aeruginosa* agglutination (i.e. presence of light blue clusters vs a diffuse blue staining in the lack of bacterial aggregates). Untreated SP-A aggregated bacteria as demonstrated by formation of clumps (light blue cluster, row 3). A similar result was observed for SP-A in the presence of inactivated

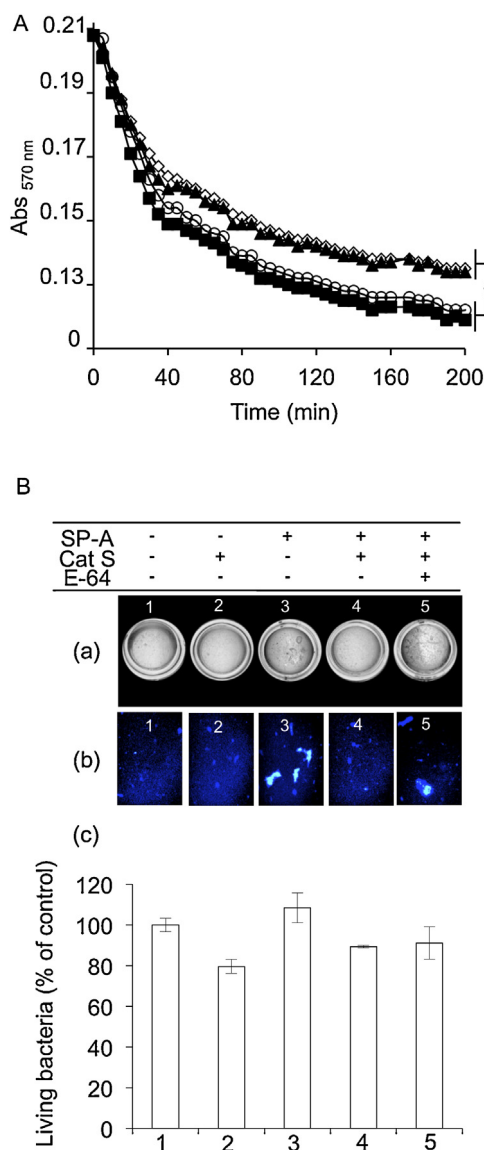


Fig. 7. Cleavage of SP-A by Cat S abrogates the agglutination of *P. aeruginosa*. (A) SP-A (3 µg) was incubated alone (○) or with Cat S (100 nM) (▲) for 1 h at 37 °C in 0.1 M sodium acetate, pH 5.5, 2 mM DTT, 0.01% Brij35. Alternatively, experiments were performed by pre-incubation of Cat S with E-64 (■). Reaction mixtures were further added to log-phase *P. aeruginosa* (3×10^7 CFU/ml) (Final volume: 200 µl). Control: bacteria alone (◇). Agglutination was monitored at 570 nm over 3 h (room temperature). Statistical significance was determined using the non-parametric Friedman test ($n=3$, * $P<0.05$). (B) Additionally the reactions were visualized as described in the experimental section by optical microscopy (panel a) and by fluorescence microscopy: DAPI staining (blue) (panel b). 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). Panel (c): bacterial viability assays were performed by using the Live/Dead BacLight Kit (Molecular Probes) following manufacturer's instructions (see for details: Section 2.10.2) ($n=3$).

Cat S (row 5). Conversely Cat S induced the loss of SP-A dependent agglutination of *P. aeruginosa* (diffuse DAPI staining, row 4). A similar staining was observed in the control well (absence of SP-A, row 1) or in the presence of Cat S alone (row 2). Moreover a viability assay (Live/Dead BacLight bacterial viability Kit) was performed. No significant difference of living bacteria was observed (Fig. 7B, panel c), indicating that Cat S by itself had no apparent effects on *P. aeruginosa* and did not display a bactericidal activity. Present data correlated with an increased bacterial proliferation and a defective clearance of *P. aeruginosa* observed for transgenic SP-A

(–/–) mice (LeVine et al., 1998). Furthermore it was reported that the broad selectivity of the monosaccharide-binding site depends on the structural integrity of CRD accordingly to that previously observed for binding to phospholipids (Weis et al., 1998). Present data confirm that cleavage of the Arg193–Gly194 bond within the solvent-exposed exposed loop of SP-A interferes with its C-type lectin activity.

In conclusion, according to *P. aeruginosa* is the pathogen most often responsible for the deaths of CF patients (Gibson et al., 2003), present data might be of major importance. In addition to well-defined biological functions of Cat S (Small et al., 2011), our results suggest a novel putative role as a deleterious host protease when cathepsins/cathepsin inhibitors balance is in favor of uncontrolled proteolysis as demonstrated for cystic fibrosis (Kasabova et al., 2011; Naudin et al., 2011). Conversely to Cat H that is involved in the processing and secretion of SP-B and thus exerts beneficial effects on pulmonary surfactant homeostasis (Buhling et al., 2011), Cat S may harmfully contribute to the degradation of hydrophilic SP-A and consequently favor 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 antibacterial 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.

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 (Département d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Centre Hospitalo-Universitaire, Tours, France & 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. McKerrrow (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).

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). AJ-G was supported by la Région Centre (France, FibroCat project) and P-MA by an INSERM-Région Centre doctoral grant. CN was a recipient of a doctoral fellowship from VLM.

References

- Bailey TC, Maruscak AA, Petersen A, White S, Lewis JF, Veldhuizen RA. Physiological effects of oxidized exogenous surfactant in vivo: effects of high tidal volume and surfactant protein A. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 2006;291:L703–9.
- Bates SR, Fisher AB. Surfactant protein A is degraded by alveolar macrophages. *American Journal of Physiology* 1996;271:L258–66.
- Bates SR, Xu J, Dodia C, Fisher AB. Macrophages primed by overnight culture demonstrate a marked stimulation of surfactant protein A degradation. *American Journal of Physiology* 1997;273:L831–9.

- Beatty AL, Malloy JL, Wright JR. *Pseudomonas aeruginosa* degrades pulmonary surfactant and increases conversion in vitro. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2005;32:128–34.
- Brea D, Meurens F, Dubois AV, Gaillard J, Chevalere C, Jourdan ML, et al. The pig as a model for investigating the role of neutrophil serine proteases in human inflammatory lung diseases. *Biochemical Journal* 2012;447:363–70.
- Brix K, Dunkhorst A, Mayer K, Jordans S. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie* 2008;90:194–207.
- Buhling F, Kouadio M, Chwieralski CE, Kern U, Hohlfield JM, Klemm N, et al. Gene targeting of the cysteine peptidase cathepsin H impairs lung surfactant in mice. *PLoS One* 2011;6:e26247.
- Casals C, Miguel E, Perez-Gil J. Tryptophan fluorescence study on the interaction of pulmonary surfactant protein A with phospholipid vesicles. *Biochemical Journal* 1993;296:585–93.
- Crouch E, Wright JR. Surfactant proteins A and D and pulmonary host defense. *Annual Review of Physiology* 2001;63:521–54.
- Deb R, Shakib F, Reid K, Clark H. Major house dust mite allergens *Dermatophagoides pteronyssinus* 1 and *Dermatophagoides farina* 1 degrade and inactivate lung surfactant proteins A and D. *Journal of Biological Chemistry* 2007;282:36808–19.
- Garcia-Verdugo I, Tanfin Z, Breuiller-Fouche M. Surfactant protein A: an immunoregulatory molecule involved in female reproductive biology. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2010;42:1779–83.
- Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2003;168:918–51.
- Griese M, Essl R, Schmidt R, Rietschel E, Ratjen F, Ballmann M, et al. Pulmonary surfactant, lung function, and endobronchial inflammation in cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2004;170:1000–5.
- Griese M, von Bredow C, Birrer P. Reduced proteolysis of surfactant protein A and changes of the bronchoalveolar lavage fluid proteome by inhaled alpha 1-protease inhibitor in cystic fibrosis. *Electrophoresis* 2001;22:165–71.
- Griese M, Wiesener A, Lottspeich F, von Bredow C. Limited proteolysis of surfactant protein D causes a loss of its calcium-dependent lectin functions. *Biochimica et Biophysica Acta* 2003;1638:157–63.
- Guilbault C, Saeed Z, Downey GP, Radzioch D. Cystic fibrosis mouse models. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2007;36:1–7.
- Gupta G, Surolia A. Collectins: sentinels of innate immunity. *Bioessays* 2007;29:452–64.
- Haagsman HP, Diemel RV. Surfactant-associated proteins: functions and structural variation. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 2001;129:91–108.
- Haagsman HP, Hogenkamp A, van Eijk M, Veldhuizen EJ. Surfactant collectins and innate immunity. *Neonatology* 2008;93:288–94.
- Head JF, Mealy TR, McCormack FX, Seaton BA. Crystal structure of trimeric carbohydrate recognition and neck domains of surfactant protein A. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:43254–60.
- Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics* 1996;14:33–8, 27–8.
- Kasabova M, Saidi A, Naudin C, Sage J, Lecaillon F, Lalmanach G. Cysteine cathepsins: markers and therapy targets in lung disorders. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* 2011;9:148–61.
- Lecaillon F, Kaleta J, Bromme D. Human and parasitic papain-like cysteine proteases: their role in physiology and pathology and recent developments in inhibitor design. *Chemical Reviews* 2002;102:4459–88.
- Lecaillon F, Weidauer E, Juliano MA, Bromme D, Lalmanach G. Probing cathepsin K activity with a selective substrate spanning its active site. *Biochemical Journal* 2003;375:307–12.
- LeVine AM, Kurak KE, Bruno MD, Stark JM, Whitsett JA, Korfhagen TR. Surfactant protein-A-deficient mice are susceptible to *Pseudomonas aeruginosa* infection. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1998;19:700–8.
- Linke M, Gordon RE, Brillard M, Lecaillon F, Lalmanach G, Bromme D. Degradation of apolipoprotein B-100 by lysosomal cysteine cathepsins. *Biological Chemistry* 2006;387:1295–303.
- Marienchek WI, Alcorn JF, Palmer SM, Wright JR. *Pseudomonas aeruginosa* elastase degrades surfactant proteins A and D. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2003;28:528–37.
- 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. *Pediatric Pulmonology* 2010;45:860–8.
- May TB, Shinabarger D, Maharaj R, Kato J, Chu L, DeVault JD, et al. Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clinical Microbiology Reviews* 1991;4:191–206.
- McCormack FX, Festa AL, Andrews RP, Linke M, Walzer PD. The carbohydrate recognition domain of surfactant protein A mediates binding to the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *Biochemistry* 1997a;36:8092–9.
- McCormack FX, Stewart J, Voelker DR, Damodarasamy M. Alanine mutagenesis of surfactant protein A reveals that lipid binding and pH-dependent liposome aggregation are mediated by the carbohydrate recognition domain. *Biochemistry* 1997b;36:13963–71.
- Naudin C, Joulin-Giet A, Couetdic G, Plesiat P, Szymanska A, Gorna E, et al. Human cysteine cathepsins are not reliable markers of infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *PLoS One* 2011;6:e25577.
- Noah TL, Murphy PC, Alink JJ, Leigh MW, Hull WM, Stahlman MT, et al. Bronchoalveolar lavage fluid surfactant protein-A and surfactant protein-D are inversely related to inflammation in early cystic fibrosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2003;168:685–91.
- Quinn DJ, Weldon S, Taggart CC. Antiproteases as therapeutics to target inflammation in cystic fibrosis. *Open Respiratory Medicine Journal* 2010;4:20–31.
- Reddy VY, Zhang QY, Weiss SJ. Pericellular mobilization of the tissue-destructive cysteine proteinases, cathepsins B, L, and S, by human monocyte-derived macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1995;92:3849–53.
- Reiser J, Adair B, Reinheckel T. Specialized roles for cysteine cathepsins in health and disease. *Journal of Clinical Investigation* 2010;120:3421–31.
- 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. *Journal of Infectious Diseases* 2004;190:1245–53.
- Ruano ML, Nag K, Worthman LA, Casals C, Perez-Gil J, Keough KM. Differential partitioning of pulmonary surfactant protein SP-A into regions of monolayers of dipalmitoylphosphatidylcholine and dipalmitoylphosphatidylcholine/dipalmitoylphosphatidylglycerol. *Biophysical Journal* 1998;74:1101–9.
- Rubio F, Cooley J, Accurso FJ, Remold-O'Donnell E. Linkage of neutrophil serine proteases and decreased surfactant protein-A (SP-A) levels in inflammatory lung disease. *Thorax* 2004;59:318–23.
- Sanchez-Barbero F, Strassner J, Garcia-Canero R, Steinhilber W, Casals C. Role of the degree of oligomerization in the structure and function of human surfactant protein A. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280:7659–70.
- Serveau-Avesque C, Martino MF, Herve-Grepinet V, Hazouard E, Gauthier F, Diot E, et al. Active cathepsins B, H, K, L and S in human inflammatory bronchoalveolar lavage fluids. *Biology of the Cell* 2006;98:15–22.
- Shang F, Rynkiewicz MJ, McCormack FX, Wu H, Cafarella TM, Head JF, et al. Crystallographic complexes of surfactant protein A and carbohydrates reveal ligand-induced conformational change. *Journal of Biological Chemistry* 2011;286:757–65.
- Small D, Burden R, Scott C. The emerging relevance of the cysteine protease cathepsin S in disease. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism* 2011;9:122–32.
- Taggart CC, Greene CM, Smith SG, Levine RL, McCray PB Jr, O'Neill S, et al. Inactivation of human beta-defensins 2 and 3 by elastolytic cathepsins. *The Journal of Immunology* 2003;171:931–7.
- Taggart CC, Lowe GJ, Greene CM, Mulgrew AT, O'Neill SJ, Levine RL, et al. Cathepsin B, L, and S cleave and inactivate secretory leucoprotease inhibitor. *Journal of Biological Chemistry* 2001;276:33345–52.
- Tate S, MacGregor G, Davis M, Innes JA, Greening AP. Airways in cystic fibrosis are acidified: detection by exhaled breath condensate. *Thorax* 2002;57:926–9.
- Turk B, Turk D, Turk V. Protease signalling: the cutting edge. *EMBO Journal* 2012a;31:1630–43.
- Turk V, Stoka V, Vasiljeva O, Renko M, Sun T, Turk B, et al. Cysteine cathepsins: from structure, function and regulation to new frontiers. *Biochimica et Biophysica Acta* 2012b;1824:68–88.
- Van Iwaarden JF, Pikaar JC, Storm J, Brouwer E, Verhoef J, Oosting RS, et al. Binding of surfactant protein A to the lipid A moiety of bacterial lipopolysaccharides. *Biochemical Journal* 1994;303:407–11.
- Veillard F, Lecaillon F, Lalmanach G. Lung cysteine cathepsins: intruders or unorthodox contributors to the kallikrein-kinin system. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2008;40:1079–94.
- Veillard F, Saidi A, Burden RE, Scott CJ, Gillet L, Lecaillon F, et al. Cysteine cathepsins S and L modulate anti-angiogenic activities of human endostatin. *Journal of Biological Chemistry* 2011;286:37158–67.
- von Bredow C, Birrer P, Griese M. Surfactant protein A and other bronchoalveolar lavage fluid proteins are altered in cystic fibrosis. *European Respiratory Journal* 2001;17:716–22.
- Voynow JA, Fischer BM, Zheng S. Proteases and cystic fibrosis. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2008;40:1238–45.
- Weis WI, Taylor ME, Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunological Reviews* 1998;163:19–34.
- Wolters PJ, Chapman HA. Importance of lysosomal cysteine proteases in lung disease. *Respiratory Research* 2000;1:170–7.

Annexe 3 : Inhibition et inactivation des enzymes

1. L'inactivation au cours du temps

La mesure de l'inactivation des enzymes au cours du temps se fait en condition de vitesse maximale (soit $[S] \gg K_m$). Ainsi, l'ordre partiel de la réaction est de 1 par rapport à l'enzyme et de 0 par rapport au substrat. La diminution de la vitesse de réaction au cours du temps est donc liée uniquement à l'inactivation de l'enzyme et non à l'épuisement du substrat. La vitesse de transformation du substrat en produit s'écrit : $[P] = [S_0](1 - e^{-k_{obs}t})$ où $[P]$ désigne la concentration en produit généré à un temps t de la réaction, $[S_0]$ désigne la concentration initiale de substrat, k_{obs} désigne la constante d'inactivation d'ordre 1 et t le temps de la réaction (**Figure 28**).

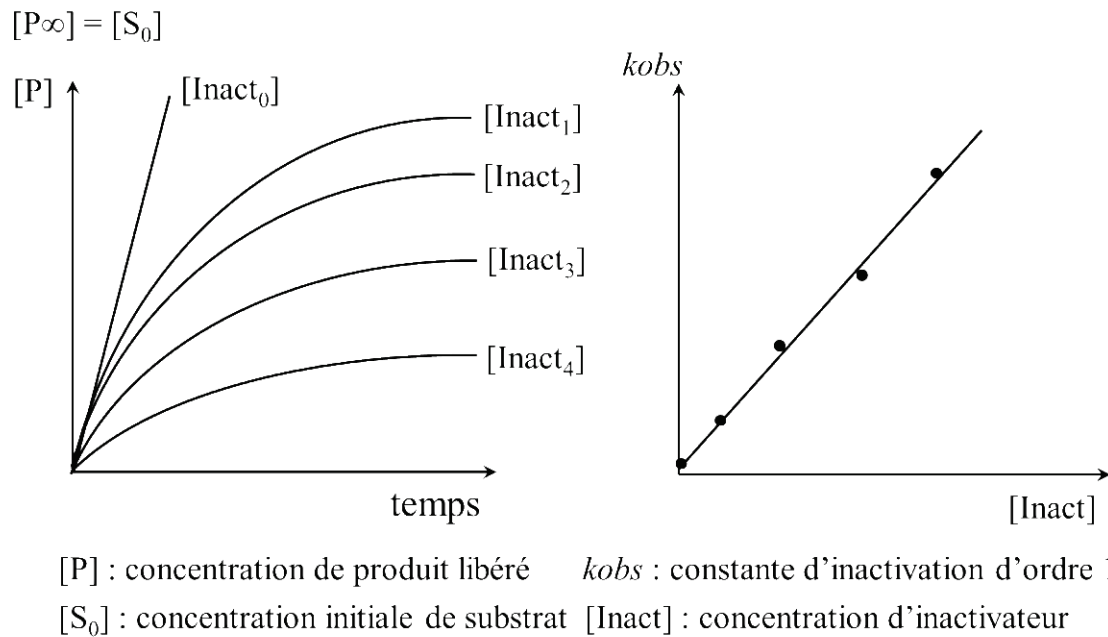
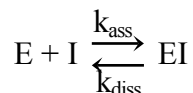


Figure 30 : Représentation de l'inactivation enzymatique au cours du temps en présence de concentrations croissantes d'agent inactivant.

La valeur de k_{obs} est proportionnelle à la vitesse d'inactivation de l'enzyme. La demi-vie de la réaction est calculée par le rapport : $t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_{obs}}$.

2. L'inhibition réversible

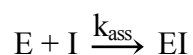
De façon générale, les interactions entre les enzymes et leurs inhibiteurs sont caractérisées par des constantes cinétiques telles que la constante d'inhibition (K_i), la constante d'association (k_{ass}) et la constante de dissociation (k_{diss}). Dans le cas de l'inhibition réversible, l'association entre l'enzyme et l'inhibiteur peut s'écrire :



Le rapport $k_{\text{diss}}/k_{\text{ass}}$ donne le K_i qui est exprimé en mol.L^{-1} . L'inhibiteur est d'autant plus efficace que la valeur de K_i est faible (forte association et faible dissociation).

3. L'inhibition irréversible

Dans le cas de l'inhibition irréversible, le complexe formé entre l'enzyme et l'inhibiteur ne se dissocie pas. Le mécanisme d'inhibition irréversible repose le plus souvent sur la formation d'une liaison covalente entre le site actif de l'enzyme et son inhibiteur. Dans ce cas l'association enzyme-inhibiteur peut s'écrire :



Ici, le K_i est égal à la valeur de la constante d'association k_{ass} .

Rôle des cathepsines à cystéine dans la régulation du peptide antimicrobien LL-37 lors de pathologies inflammatoires chroniques pulmonaires

Résumé

Lors de pathologies pulmonaires inflammatoires chroniques comme la mucoviscidose ou la BPCO, le déséquilibre de la balance protéases/antiprotéases aboutit à la dégradation du tissu pulmonaire et à l'inactivation des défenses antimicrobiennes. Les cathepsines à cystéine participent à l'inactivation protéolytique de peptides et protéines antimicrobiens (PAMs) pulmonaires comme le SLPI, la lactoferrine, et les β -défensines HBD-2 et -3 lors de l'emphysème ou de la mucoviscidose. Lors de cette thèse, nous avons étudié la capacité des cathepsines à cystéine B, K, L et S à hydrolyser le peptide LL-37, qui est un PAM important dans l'immunité innée pulmonaire. Seules les cathepsines K et S clivent le LL-37 et inactivent efficacement son activité antimicrobienne. A l'inverse, le LL-37 est un inhibiteur compétitif de la cathepsine L. D'autre part, l'expression pulmonaire de la cathepsine S est fortement augmentée chez les individus fumeurs atteints ou non de BPCO. La fumée de cigarette qui est une source importante de stress oxydatif induit une augmentation significative de l'expression et l'activité de la cathepsine S. Malgré un environnement oxydatif non favorable à l'activité des cathepsines, la cathepsine S parvient à hydrolyser le peptide LL-37 et pourrait ainsi augmenter le risque d'exacerbation lors de la BPCO.

Mots clé : cathepsines à cystéine, peptides antimicrobiens, LL-37, inflammation pulmonaire

Abstract

During chronic inflammatory lung diseases like cystic fibrosis or COPD, proteases/antiproteases imbalance leads to pulmonary tissue degradation and compromise antimicrobial barrier. Cysteine cathepsins are involved in the proteolytic inactivation of several lung antimicrobial peptides (AMPs) such as SLPI, lactoferrin and β -defensins -2 and -3 during emphysema or cystic fibrosis. During this thesis, we studied the ability of cathepsins B, K, L and S to degrade LL-37, which is an important AMP in lung immunity. Only cathepsins K and S degrade readily LL-37 and inactivate its antimicrobial property. Conversely, LL-37 is a competitive inhibitor of cathepsin L. Beside, lung expression of human cathepsin S is significantly increased in smokers with or without COPD compared to non-smokers. Cigarette smoke that is a major source of oxidative stress significantly increases the expression and activity of cathepsin S. Despite an unfavorable oxidative environment, cathepsin S retains its proteolytic activity toward LL-37 and thus could participate to COPD exacerbation.

Key words: Cysteine cathepsins, antimicrobial peptides, LL-37, lung inflammation