

025 Protéases du neutrophile et BPCO : Caractérisation et spécificité des protéases à sérine du modèle murin

T. Kalupov¹, M. Brillard¹, S. Dade¹, R. Boxio²,
T. Moreau¹, A. Belaouaj², F. Gauthier¹

¹ U618 « Protéases et vectorisation pulmonaires » Tours, France.

² U514 « Dynamique cellulaire et moléculaire de la muqueuse respiratoire » Reims, France.

francis.gauthier@univ-tours.fr

Introduction : Le rôle des protéases à sérine du neutrophile [élastase (NE), protéase 3 (Pr3), cathepsine G (CG)] dans la chronicité de la réaction inflammatoire et les remaniements structuraux du tissu pulmonaire qui caractérisent la BPCO restent mal connus. La progression des connaissances fondamentales passe par l'utilisation de modèles animaux. La souris exposée à la fumée de cigarette apparaît comme le plus adapté à ce type d'étude d'autant que des souris KO vis-à-vis d'une ou plusieurs des protéases du neutrophile impliquées dans la destruction du tissu pulmonaire sont disponibles. Cependant les propriétés des NE, Pr3 et CG murines n'ont pas été étudiées en détail et il est donc nécessaire de comparer leur spécificité enzymatique à celle des protéases humaines de façon à valider chez l'homme les résultats expérimentaux obtenus avec le modèle animal.

Méthodes et résultats : Nous avons isolé et caractérisé les 3 protéases à sérine murines, et étudié leur spécificité enzymatique en utilisant des substrats à extinction interne de fluorescence précédemment développés pour leurs homologues humains. Des différences sensibles ont été observées entre les enzymes des 2 espèces, empêchant toute mesure précise d'activité de la Pr3. Nous avons construit par homologie un modèle de structure de la Pr3 murine et comparé les potentiels électrostatiques de surface avec ceux de la Pr3 humaine. Cette analyse a permis de concevoir un nouveau substrat dont la spécificité pour la Pr3 murine augmente très sensiblement alors qu'elle diminue considérablement pour la Pr3 humaine, ce qui confirme les prédictions de modélisation moléculaire. Ce substrat n'est pas hydrolysé par la NE et la CG de souris et permet donc de suivre spécifiquement l'activité de la Pr3 de souris dans les fluides et tissus pulmonaires. Une démarche similaire est actuellement mise en œuvre pour mesurer spécifiquement NE et CG de souris.

Conclusion : L'identification des cibles moléculaires générées par l'action protéolytique des protéases à sérine du neutrophile dans le modèle murin au cours des épisodes aigus de BPCO passe par une connaissance approfondie de la spécificité de ces protéases. Cela contribuera à la validation du modèle murin de BPCO et facilitera la transposition des résultats chez l'homme pour mieux comprendre la physiopathologie de la maladie.

026 Dégradation de la cadhérine E par l'élastase du neutrophile

R. Boxio¹, B. Nawrocki-Raby¹, J.M. Perotin², J.M. Zahm¹,
N. Bonnet¹, P. Birembaut¹, F. Lebargy², A. Belaouaj¹

¹ UMRS INSERM 514, IFR 53, CHU Maison-Blanche, Reims, France.

² Service des maladies respiratoires, CHU Maison-Blanche, Reims, France.

rachel.boxio@univ-reims.fr

Introduction : En dehors de son rôle physiologique, le neutrophile peut engendrer des lésions tissulaires. En effet, plusieurs études ont impliqué l'élastase du neutrophile (*neutrophil elastase*, NE) dans le développement de pathologies pulmonaires tel que l'emphysème. L'hypothèse étant que dans des conditions anormales, le neutrophile déverse son contenu dans l'espace extracellulaire y compris NE, induisant des lésions pulmonaires. Cependant, le rôle et le mécanisme de NE dans la pathogénèse des lésions pulmonaires sont encore mal définis. Nous avons postulé que NE dégrade les protéines de jonctions de l'épithélium respiratoire, induisant la perte de l'intégrité de celui-ci. Dans ce projet, nous avons focalisé sur la cadhérine-E (Cad-E), protéine majeure des jonctions cellulaires des tissus épithéliaux.

Méthodes : Nous avons exposé des souris sauvages et déficientes en NE à un modèle murin de lésion pulmonaire induit par instillation intranasale de *P. aeruginosa*. Nous avons analysé les lavages bronchoalvéolaires (LBA) par *Western blotting* et zymographie pour détecter la présence d'activités enzymatiques et la Cad-E (ou ses produits de dégradation). Parallèlement, des lignées de cellules épithéliales pulmonaires ont été mises en culture en présence de NE et/ou son inhibiteur physiologique, *Secretory Leukocyte Protease Inhibitor* (SLPI). Nous avons ensuite examiné l'intégrité du tapis cellulaire et la dégradation de la Cad-E par les techniques de vidéomicroscopie et de *Western blotting*. Enfin, des LBA de patients atteints de pathologies pulmonaires ont été analysés pour la présence des produits de dégradation de la Cad-E.

Résultats : L'analyse des immunoempreintes réalisées sur les LBA des souris infectées nous a permis de détecter la présence de la Cad-E clivée. Cette dégradation a été plus importante chez les souris sauvages que chez les souris knock-out. Nos résultats d'immunoempreinte des cultures cellulaires ont confirmés que le clivage de la Cad-E est médié par NE. En effet, l'addition de SLPI en culture cellulaire a protégé les cellules épithéliales contre l'effet lésionnel de NE. En vidéomicroscopie, nous avons observé que la perte de l'intégrité du tapis cellulaire s'accompagnait de l'altération de la cohésion intercellulaire ainsi que la disparition de la Cad-E immunomarquée. L'analyse des LBA humains par WB a révélé le même profil de dégradation de la Cad-E que chez la souris.

Conclusion : Cette étude démontre, pour la première fois, que NE a la capacité de dégrader la Cad-E et contribuerait ainsi aux lésions tissulaires observées dans différentes pathologies pulmonaires tel que l'emphysème.