



UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE –ARDENNE
ECOLE DOCTORALE SCIENCES TECHNOLOGIE SANTE

Unité Immunité Adaptative et fonctionnalité des Barrières Biologiques - IMAB – EA 4683
Laboratoire d'immunologie – UFR de Pharmacie

THESE

Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
Discipline : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement

Par :

Mehdi SELLAMI

Le 17 juillet 2013

**Peptides d'élastine et inflammation pulmonaire au
cours de la Broncho-Pneumopathie Chronique
Obstructive (BPCO)**

Jury :

M. le Professeur Gaëtan DESLEE, Président
M. le Professeur Richard LE NAOUR, Directeur de thèse
M. le Professeur Didier BETBEDER, Rapporteur
M. le Professeur Philippe BILLIALD, Rapporteur
M. le Docteur Gautier MOROY, Examineur
Mme. le Docteur Stéphanie HERY-HUYNH, Invitée

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. Didier BETBEDER ainsi que le Pr. Philippe BILLIALD d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail de thèse.

Je souhaite remercier également le Pr. Gaëtan DESLEE et le Dr. Gautier MOROY d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie le Pr. Moncef GUENOUNOU de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire l'unité EA4303 et le Dr. Richard LE NAOUR pour m'avoir accueilli par la suite dans l'unité EA4683 et pour m'avoir fourni les moyens nécessaires afin de mener cette recherche à bien.

Je remercie le Dr. Richard LE NAOUR de m'avoir accepté comme étudiant en thèse ainsi que de m'avoir encadré durant l'ensemble de ce projet.

Je souhaite remercier particulièrement le Dr. Stéphanie HERY-HUYNH pour la patience et l'investissement dont elle a fait preuve à mon égard pour me former et m'encadrer dans mes travaux de modélisation moléculaire. Je la remercie également pour sa gentillesse et son écoute.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des membres présents et passés du laboratoire pour m'avoir aidé dans la réalisation de ce travail.

Je souhaite remercier l'ensemble du personnel du laboratoire d'Anatomie et Pathologie dirigé par le Pr. Marie Danièle DIEBOLD et plus particulièrement Caroline BERTHOLET, Nicole BOULAND, Jinah CHAN CHAO YUN et Savise NASRI pour leur aide technique indispensable, ainsi que leur gentillesse.

Enfin je remercie le Dr. Christine TERRYN pour son aide précieuse dans la mise au point des diverses techniques d'imageries et d'analyse d'image.

Je ne pourrais finir sans remercier l'ensemble de ma famille pour leur soutien. Mes parents, Nadia, Nasseur, Hedi pour cette magnifique colocation que je n'oublierais jamais (To be continued...). Iskander pour m'avoir réveillé tous ces matins même si j'ai réussi à me venger. Amandine pour m'avoir soutenu et m'avoir permis de faire simultanément deux thèses : la mienne et la sienne par procuration. Je remercie également simple Arnal, ibib et le gay les rois de l'accrobranche. Enfin je remercie mon disciple exilé que je vais bientôt retrouver.

Merci également à tous les autres, tous ceux qui de près ou de loin m'ont aidé à réaliser ce travail, mais que je ne citerais pas pour n'oublier personne.

Merci à tous...

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES.....	5
LISTE DES TABLEAUX.....	7
LISTE DES ABREVIATIONS.....	8
CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET PRESENTATION DU MANUSCRIT	11
PARTIE 1 : Introduction	15
I. Appareil respiratoire et broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO).....	16
1. L'Appareil respiratoire.....	16
1.1. Généralités.....	16
1.2. Anatomie de l'appareil respiratoire.....	16
1.3. La muqueuse et l'épithélium respiratoire.....	20
1.4. Immunité de l'appareil respiratoire.....	24
1.5. La ventilation au niveau de l'appareil respiratoire.....	32
2. La BPCO.....	35
2.1. Généralités.....	35
2.2. Définition et classification.....	35
2.3. Physiopathologie de la BPCO.....	37
II. Elastine et Peptides d'Elastine	43
1. La structure des protéines.....	43
1.1. Structure primaire.....	44
1.2. Structure secondaire.....	44
1.3. Structure tertiaire.....	51
1.4. Structure quaternaire	52
2. La matrice extracellulaire.....	53
1.3. Les protéoglycanes (PG).....	54
1.4. Les glycoprotéines (GP).....	55
1.5. Les collagènes.....	55

1.6. L'élastine	56
2. L'élastine : structure génique et synthèse	56
2.1. Généralités.....	56
2.2. Structure et régulation du gène de l'élastine.....	58
2.3. Elastogénèse.....	60
4. Les Peptides d'élastine	68
4.1. Généralités.....	68
4.2. Genèse des peptides d'élastine.....	68
4.3. Propriétés biologiques des peptides d'élastine.....	69
4.4. Propriétés structurales des peptides d'élastine : approche in silico.....	74
5. Le Récepteur de l'élastine.....	76
5.1. Le complexe récepteur de l'élastine.....	76
5.2. Les voies de signalisation dépendantes de l'EBP.....	78
5.3. Les autres récepteurs.....	80
5.4. Modèles structuraux du récepteur de l'élastine : approche in silico.....	80
PARTIE 2 : But du travail.....	84
PARTIE 3 : Matériels et Méthodes	86
I. Mécanique Moléculaire	88
1. Fonction d'énergie potentielle.....	88
2. Traitement des interactions non liantes	90
3. Traitement du solvant.....	91
II. Dynamique Moléculaire	93
1. Principe.....	93
2. Détails d'un protocole de simulation	95
2.1. Préparation du système.....	95
2.2. Minimisation.....	95
2.3. Chauffage.....	95
2.4. Equilibrage.....	96

2.5. Production.....	96
3. Analyse.....	97
3.1. Séries temporelles.....	97
3.2. Analyse des coudes β	97
III. Docking Moléculaire	98
1. Principe.....	98
2. Analyse des résultats	101
PARTIE 4 : Résultats	103
I. Induction and regulation of murine emphysema by elastin peptides	104
II. Résultats complémentaires	151
1. Résultats complémentaires sur les séquences PGXXP et VGXXP	151
1.1. Simulations de Dynamique moléculaire.....	152
1.2. Calculs de Docking Moléculaire.....	157
2. Résultats complémentaires sur le peptide GGVVAP.....	161
PARTIE 5 : Conclusion/Discussion et Perspectives	164
PARTIE 6 : Bibliographie.....	169
1999 Regulation of cell activity by the extracellular matrix: the concept of matrikines J Soc Biol 193(4-5) : 423-8	182
PARTIE 7 : Contributions scientifiques complémentaires.....	192

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Division de l'appareil respiratoire	17
Figure 2 : Les voies aériennes supérieures (coupe sagittale médiane)	18
Figure 3 : Les poumons	19
Figure 4 : Epithélium de type respiratoire	21
Figure 5 : Les différentes jonctions intercellulaires	22
Figure 6 : Représentation d'alvéoles emphysémateuses	35
Figure 7 : BPCO et inflammation chronique	40
Figure 8 : Peptides d'élastine et implication dans la BPCO	42
Figure 9 : Structures et codes à 3 et 1 lettre(s) des 20 acides aminés	45
Figure 10 : Représentation des angles dièdres ω , φ et ψ	45
Figure 11 : Représentation de liaisons peptidiques trans ($\omega=180^\circ$) et cis ($\omega=0^\circ$)	46
Figure 12 : Cartes de Ramachandran	47
Figure 13 : Différents types d'hélices	47
Figure 14 : Feuilletts β (a) anti-parallèles et (b) parallèles	49
Figure 15 : Représentation d'un coude β	50
Figure 16 : Structure tertiaire d'une toxine fongique (code pdb 1KPT)	52
Figure 17 : Structure quaternaire de l'hémoglobine	53
Figure 18 : Répartition des fibres de collagène dans la plèvre viscérale	56
Figure 19 : Organisation des fibres élastiques selon la localisation du tissu considéré	58
Figure 20 : Structure schématique de l'ADNc de la tropoélastine humaine	59
Figure 21 : Séquence de la tropoélastine humaine.	62
Figure 22 : Modèle classique de l'assemblage des fibres élastiques	63
Figure 23 : Modèle de formation des liaisons croisées de l'élastine	65
Figure 24 : Représentation schématique d'une fibre élastique	65
Figure 25 : Modèles structuraux de l'élastine	67

Figure 26 : Effet chimio-attractant des PE vis-à-vis des neutrophiles au cours de la BPCO	72
Figure 27 : Représentation d'un coude β de type VIII sur le motif GXXP.	75
Figure 28 : Représentation schématique du complexe récepteur de l'élastine	76
Figure 29 : Représentation schématique des transcrits primaires de la β -gal et de l'EBP.	77
Figure 30 : Effets des galactosucres sur le récepteur de l'élastine	78
Figure 31 : Synthèse des voies de signalisation mises en jeu lors de l'interaction	79
Figure 32 : Homologies de séquence du peptide S-gal	81
Figure 33 : Modèle d'interaction entre PE et PPE	81
Figure 34 : Modèle tridimensionnel de l'EBP obtenu par modélisation par homologie.	83
Figure 35 : Différents termes de la fonction d'énergie potentielle pour les interactions liantes : a) liaisons, b) angles, c) angles impropres et d) torsions dièdres.	89
Figure 36 : Traitement des interactions non liantes	90
Figure 37 : Création des 26 images autour du système initial pour appliquer les conditions périodiques aux limites.	92
Figure 38 : Suivi a) de l'énergie totale et b) de la température du système durant les différentes phases de la dynamique moléculaire.	97
Figure 39 : Représentation d'une grille de $126 \times 126 \times 126$ points construite avec AUTOGRID au niveau du site d'interaction avec un pas de $0,2 \text{ \AA}$	100
Figure 40 : Classement des conformations par clusters de plus basses énergies	102
Figure 41 : Fréquences et pourcentages de coudes β présents sur les séquences PGXX et GXXP en fonction du temps lors des simulations de dynamique moléculaire des peptides PGXXP.	155
Figure 42 : Fréquences et pourcentages de coudes β présents sur les séquences PGXX et GXXP en fonction du temps lors des simulations de dynamique moléculaire des peptides VGXXP.	156
Figure 43 : Caractéristiques de l'interaction prédite par AutoDock entre VGVAPG (rose), PGPAP (bleu) et la séquence S-gal (orange) présente à la surface de la PPE (gris).	160
Figure 44 : Evolutions temporelles de (A) la distance $C_{\alpha}-C_{\alpha}$ entre les résidus Gly-3 et Pro-6 et (B) la présence des coudes β sur la séquence GGVAP au cours de la trajectoire de dynamique moléculaire.	162
Figure 45 : Illustration des deux modèles d'interaction observés par docking pour le peptide GGVAP.	163

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Molécules à activité antimicrobienne présentes dans l'arbre respiratoire.....	27
Tableau 2 : PRR et PAMP du système de défense anti-infectieuse pulmonaire.....	28
Tableau 3 : Classification spirométrique de la sévérité de la BPCO	36
Tableau 4 : Valeurs de référence des angles dièdres des différents types de coudes β	50
Tableau 5 : Exemples des effets biologiques induits par les peptides d'élastine.....	73
Tableau 6 : Caractéristiques des meilleures structures obtenues par docking entre la PPE et les différents peptides PGX ₁ X ₂ P et VGX ₁ X ₂ P.....	159

LISTE DES ABREVIATIONS

AAA : Anévrisme Aortique Abdominal
Ac : Anticorps
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
Ag : Antigène
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
Akt : Protéine kinase B
AP- : Activator Protein
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
CD- : Cluster of Differentiation
CD : Cellule Dendritique
cm : centimètre
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CO₂ : Dioxyde de Carbone
CRE : Complexe Récepteur de l'Elastine
CRP : C-Reactive Protein
CT : Capacité Totale
CV : Capacité Vitale
EBP : Elastin Binding *Protein*
ERK 1/2 : Extracellular signal-Regulated protein Kinase 1/2
FAK : Focal Adhesion Kinase
FEV : Forced Expiratory Volume
FVC : Forced Vital Capacity
G-CSF : Granulocyte Colony Stimulating Factor
GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique
GOLD : Global initiative for chronic-Obstructive Lung Disease
GRO- α : Growth Regulated Oncogen alpha
h : heure
ICAM : Intracellular Cell Adhesion Molecule
IFN- : Interféron
IgM : Immunoglobuline M
IL- : Interleukine

IP-10 : Inducible Protein 10
 kDa : kilo Dalton
 LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire
 LBP : LPS Binding Protein
 LDL : Lipoprotéine de basse densité
 LOXL : Lysyl oxydase
 LPS : Lipopolysaccharide
 LRR : Régions riches en résidus leucine
 LT : Lymphocyte T
 m : mètre
 MAGP-1 : Microfibril Associated Glycoprotein 1
 MAGP-2 : Microfibril Associated Glycoprotein 2
 MALT : Tissu Lymphoïde Associé aux Muqueuses
 MARCO : macrophage receptor with collagenous structure
 MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
 MEC : Matrice Extra-Cellulaire
 MEK 1/2 : MAPK/ERK Kinase 1 et 2
 min : minute
 MIP : Macrophage inflammatory protein
 ml : millilitre
 MMP : Matrix Metalloproteinase
 MUC : Mucine
 NE : Neutrophil Elastase
 Neu-1 : Neuraminidase-1
 NF- κ B : Nuclear Factor- κ B
 NK : Natural Killer
 NO₂ : Dioxyde d'Azote
 NOD : nucleotide binding oligomerisation domain
 O₂ : Dioxygène
 PAMPs : Pathogen-Associated Molecular Pattern
 PDGF : Platelet Derived Growth Factor
 PE : Peptide d'Elastine
 PI3K : Phosphatidyl Inositol 3 Phosphate
 PKC : Protéine Kinase C
 PLC : Phospholipase-C
 PN : Polynucléaire Neutrophile

Pp : Pression partielle

PP : Polyproline

PPCA : Protective Protein Cathepsin-A

PPE : Elastase Pancréatique Porcine

PRRs : Pattern Recognition Receptor

RANTES : Regulated upon Activation Normal T Expressed and Secreted

RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux

s : seconde

SAP : Serum amyloid protein

SLPI : Secretory Leucoprotease Inhibitor

SO₂ : Dioxyde de Soufre

SP-1 : Specific Protein 1

Src : Sarcoma

TLR : Toll Like Receptor

TNF- α : Tumor necrosis factor- α

VC : Volume Courant

VRE : Volume de Réserve Expiratoire

VRI : Volume de Réserve Inspiratoire

μ l : microlitre

CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET PRESENTATION DU MANUSCRIT

Le poumon est un organe impliqué dans le processus respiratoire et en contact permanent avec l'air ambiant. Il est quotidiennement exposé à des contaminants présents dans l'air respiré, tels que des produits toxiques ou des agents pathogènes. Au cours de l'évolution, le poumon a mis en place de nombreux mécanismes de protection et de défenses qui lui permettent de résister aux différentes agressions. C'est l'épithélium respiratoire qui représente la première ligne de défense contre les agressions au niveau pulmonaire. L'épithélium respiratoire est une barrière physique cohésive qui, associée au système muco-ciliaire, permet d'éliminer les différents éléments étrangers présents dans l'air. L'épithélium respiratoire joue également un rôle métabolique et immunitaire important. Il produit des mucines et des défensines qui sont impliquées dans la réponse immunitaire innée. Par la production de cytokines et de chimiokines, l'épithélium régule également la fonction immunitaire adaptative. L'immunité innée au niveau de l'appareil respiratoire permet de bloquer et d'éliminer les agents pathogènes ayant échappés aux premières lignes de défenses. Elle est d'apparition rapide après l'infection et met en jeu principalement les monocytes/macrophages et les polynucléaires neutrophiles. Ces populations cellulaires, une fois arrivées au niveau du site inflammatoire et/ou infectieux, sécrètent de nombreux médiateurs de l'inflammation qui participent à l'élimination des agents pathogènes. Lorsque l'immunité innée n'est pas suffisante, l'immunité adaptative prend le relais. Elle permet au poumon de se débarrasser des microorganismes virulents échappant au contrôle de l'immunité innée. Au cours de certaines pathologies, le poumon est le siège d'une inflammation chronique qui conduit à une dérégulation de ses systèmes de défense. C'est le cas en particulier au cours de la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO).

La BPCO est une affection de l'appareil respiratoire caractérisée par une inflammation chronique du parenchyme pulmonaire et une détérioration progressive et irréversible des voies aériennes. C'est une maladie qui engage le pronostic vital et interfère avec le processus normal de la respiration. L'emphysème est la forme principale de la BPCO et l'exposition à la fumée de tabac en est le principal facteur étiologique. La BPCO est associée à une réponse

inflammatoire et immunitaire anormale au niveau du parenchyme pulmonaire. L'accumulation des cellules inflammatoires dans le parenchyme et dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) est contemporaine de la sécrétion de nombreuses protéases impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC).

La matrice extracellulaire est un composant acellulaire formant un réseau tridimensionnel qui sert de support architectural aux cellules. Elle est composée de macromolécules et de fibres protéiques. La dégradation des protéines de la MEC par les protéases conduit à la libération de peptides qui, lorsqu'ils sont doués d'activité biologiques, sont appelés "matrikines". Les matrikines agissent via des interactions avec des récepteurs spécifiques et déclenchent différentes cascades de signalisation intracellulaire impliquées dans de nombreux processus physiologiques et/ou pathologiques comme la cicatrisation, la progression tumorale, la prolifération et la migration cellulaire...L'élastine est une protéine essentielle de la MEC. Sous l'effet de protéases à activité élastinolytique, l'élastine est dégradée en peptides solubles d'élastine. L'activité biologique des peptides d'élastine s'exerce via leur interaction avec le Complexe Récepteur de l'Elastine. Ce complexe se compose de trois sous-unités distinctes dont l'EBP (pour Elastin Binding Protein) qui porte le site de liaison à l'élastine ou aux peptides d'élastine. Pour pouvoir se lier à l'EBP, les peptides d'élastine doivent posséder une séquence GXXP repliée en un coude β de type VIII. La présence d'un résidu glycine en position C-terminale de la séquence (GXXPG) est nécessaire à l'activité biologique du peptide. Le peptide VGVAPG, dont la séquence est répétée 6 fois dans chaque molécule de tropoélastine constituant la fibre d'élastine, est le chef de file des peptides d'élastine à activité biologique. Des travaux antérieurs réalisés dans le laboratoire nous ont permis de montrer que le peptide VGVAPG régule les propriétés biologiques des cellules cibles de l'immunité telles que les monocytes, les lymphocytes T et les polynucléaires neutrophiles humains.

La genèse des peptides d'élastine est observée dans les pathologies inflammatoires affectant les organes riches en élastines comme les poumons, les artères ou la peau. Au cours de la BPCO, la forte excrétion de desmosine, marqueur spécifique de la dégradation de l'élastine, et les taux élevés de peptides d'élastine dans les différents liquides biologiques ont permis de mettre en évidence une dégradation intense de l'élastine pulmonaire chez les patients atteints de cette pathologie. Par ailleurs, le niveau de protéases élastinolytiques dans les LBA de patients atteints d'emphysème est corrélé avec le niveau de peptides d'élastine dans ces mêmes fluides. Un travail récent réalisé dans notre Unité a décrit les peptides d'élastine comme de puissants modulateurs des fonctions effectrices des polynucléaires neutrophiles au cours de la BPCO. En outre, l'utilisation d'un modèle expérimental

d'emphysème murin a permis de montrer *i/* que les taux élevés de peptide d'élastine dans les LBA sont corrélés avec la progression de la maladie emphysemateuse chez la souris et *ii/* que les peptides d'élastine, par le biais de leurs propriétés chimiotactiques, participent à l'infiltration de polynucléaires neutrophiles et de monocytes sanguins dans le parenchyme pulmonaire et donc au processus inflammatoire chez la souris emphysemateuse. Sur la base de ces données de la littérature et de nos travaux sur les peptides d'élastine, nous avons émis l'hypothèse que les peptides d'élastine avaient un rôle central au cours de la BPCO et que l'exposition de souris à ces peptides pouvait être suffisante pour déclencher un emphysème chez l'animal.

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit a donc porté sur l'étude du rôle joué par les peptides d'élastine dans l'induction d'un emphysème pulmonaire chez la souris. Pour cela, des souris ont reçu par instillation intra-trachéale une dose unique du peptide de référence VGVAPG et les paramètres biologiques associés à l'installation d'un emphysème ont été étudiés et comparés à ceux obtenus après exposition des souris à l'élastase pancréatique porcine (PPE) décrit dans la littérature comme un modèle de référence d'emphysème murin. Par ailleurs, pour conforter notre hypothèse de travail, nous avons sélectionné par des méthodes de modélisation moléculaires des peptides d'élastine potentiellement inactifs mais favorablement repliés en coudes β de type VIII pour interagir avec le récepteur à l'élastine. Les capacités antagonistes de ces peptides vis-à-vis des effets du peptide VGVAPG ont été évaluées *in vitro* puis *in vivo*.

Le manuscrit est organisé en quatre parties :

La première partie est une introduction qui présente l'état des connaissances actuelles sur *i)* l'appareil respiratoire et la BPCO, *ii)* l'élastine et les peptides issus de sa dégradation, et *iii)* le récepteur à l'élastine et les modèles structuraux du récepteur à l'élastine permettant des approches *in silico* de sélection de peptides d'élastine ayant une conformation spatiale compatible avec une interaction avec leur récepteur.

La deuxième partie présente un "matériels et méthodes" venant en complément de la partie "materials and methods" décrit dans l'article intégré au manuscrit et détaillant plus largement les techniques de dynamique et de docking moléculaire utilisées dans ce travail de thèse.

La troisième partie présente les résultats que nous avons obtenus dans ce travail de thèse et qui ont fait l'objet de la rédaction d'un article que nous allons soumettre pour publication

dans "*Journal of Clinical Investigation*" sous le titre "*Induction and regulation of murine emphysema by elastin peptides*". Des résultats complémentaires n'apparaissant pas dans cet article sont également présentés dans cette troisième partie.

Enfin la quatrième partie du manuscrit fait la synthèse de l'ensemble du travail effectué dans ce travail de thèse au travers d'une discussion/conclusion et de perspectives.

L'ensemble du travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé à l'UFR de Pharmacie de Reims au sein de l'EA 4303 "Inflammation et immunité de l'épithélium respiratoire" (Directeur : A. Belaouaj) et de l'EA 4683 "Immunité adaptative et fonctionnalité des barrières biologiques" (Directeur : R. Le Naour). Ce travail s'intègre dans l'axe II "Infection et Immunité" de la SFR-CAPSanté.

PARTIE 1 : Introduction

I. Appareil respiratoire et broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO)

La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une affection de l'appareil respiratoire caractérisée par un blocage persistant de l'écoulement des gaz inspirés au niveau des poumons. C'est une maladie pulmonaire, qui engage le pronostic vital, interfère avec le processus normal de la respiration et n'est pas entièrement réversible. La limitation des capacités respiratoires est progressive. Elle est associée à une réponse inflammatoire anormale au niveau du parenchyme pulmonaire (Rabe *et al.*, 2007).

1. L'Appareil respiratoire

1.1. Généralités

La respiration est un processus vital ayant pour but d'oxygéner le sang et d'éliminer le CO₂ présent dans ce dernier. L'air est dans un premier temps acheminé vers les "zones respiratoires" du poumon par les différentes voies aériennes jusqu'aux alvéoles respiratoires où ont lieu les échanges gazeux entre l'air et le sang. L'ensemble de l'arbre respiratoire est recouvert d'une muqueuse qui est en contact permanent avec l'air ambiant. La muqueuse respiratoire est exposée à de multiples contaminants présents dans l'air respiré, tels que des produits toxiques ou des agents pathogènes. Afin d'obtenir une quasi-stérilité aux lieux des échanges gazeux, les diverses particules ou agents pathogènes inhalés doivent être captés et éliminés. Différents mécanismes interviennent pour réaliser cette fonction. L'épithélium respiratoire par sa fonction de barrière physique et son activité de clairance muco-ciliaire ainsi que le système immunitaire de l'appareil respiratoire sont impliqués dans cette fonction.

1.2. Anatomie de l'appareil respiratoire

L'appareil respiratoire est divisé en deux parties. La première partie représente les voies aériennes supérieures (ou extra-pulmonaires) qui comprennent les fosses nasales, le pharynx, le larynx, la trachée, et les bronches souches. La seconde partie représente les voies aériennes

inférieures (ou intra-thoraciques) qui sont composées des bronches segmentaires, des bronchioles et des alvéoles pulmonaires. La trachée, les bronches souches, les bronches segmentaires constituent les voies conductrices aériennes qui se divisent de manière dichotomique (*Figure 1*). Cela commence par la trachée (1^{ère} génération) qui va se diviser en deux pour donner naissance aux bronches droite et gauche qui vont alors s'enfoncer dans leur poumon respectif. Les deux bronches vont ensuite se subdiviser en bronches lobaires puis segmentaires (2^{ème} à 8^{ème} générations) qui, elles-mêmes, vont subir de nouvelles segmentations pour donner les bronchioles et les bronchioles terminales (8^{ème} à 19^{ème} générations) mesurant respectivement moins de 1 mm et moins de 0,5 mm de diamètre. On trouve enfin les alvéoles pulmonaires, qui dérivent des bronchioles terminales et qui constituent l'élément respiratoire du poumon (19^{ème} à 23^{ème} générations).

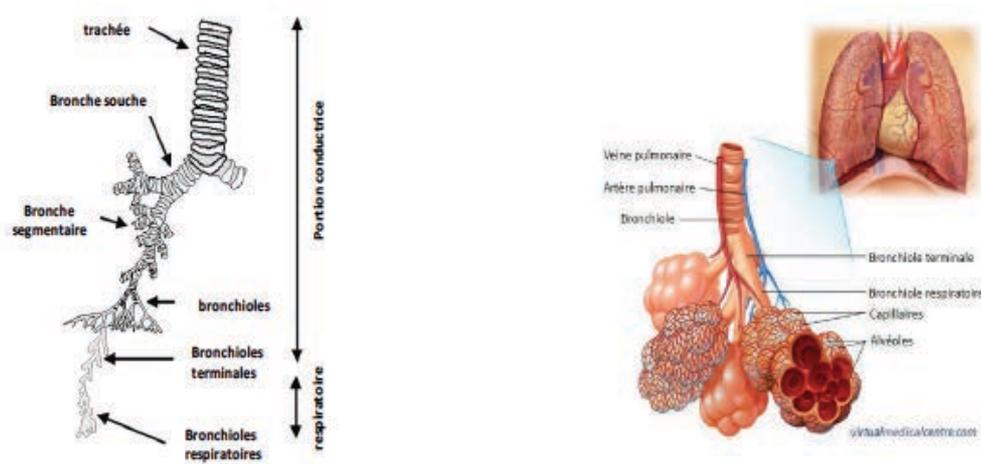


Figure 1 : Division de l'appareil respiratoire

1.2.1. Les voies aériennes supérieures

L'air pénètre par les narines (*Figure 2*) dans les fosses nasales où il sera "pré-conditionné" au contact de la muqueuse pour être réchauffé, humidifié et filtré grâce aux poils qui tapissent les fosses nasales. Les poils arrêtent les poussières en suspension et une partie des microbes. Les fosses nasales sont en communication avec :

- Les sinus : cavités emplies d'air, reliées aux fosses nasales par de fins canaux. Les principaux sont les sinus frontaux et maxillaires
- L'oreille moyenne par l'intermédiaire des trompes d'Eustache

Le pharynx est une zone de convergence faisant communiquer dans sa partie supérieure les fosses nasales et la cavité buccale et, dans sa partie inférieure, l'œsophage (en arrière) qui achemine aliments et liquides vers l'estomac et le larynx (en avant) où seul l'air pénètre. Le larynx est l'organe de la parole et l'épiglotte est un clapet cartilagineux qui obture le larynx lors de la déglutition : l'ensemble du larynx se déplace vers le haut, ce qui permet à l'épiglotte de se refermer sur le larynx et d'empêcher le passage des aliments dans la trachée. La trachée est un simple conduit aérien formé d'une armature cartilagineuse qui se divise en deux bronches souches. L'air continue à y être filtré, humidifié et réchauffé.

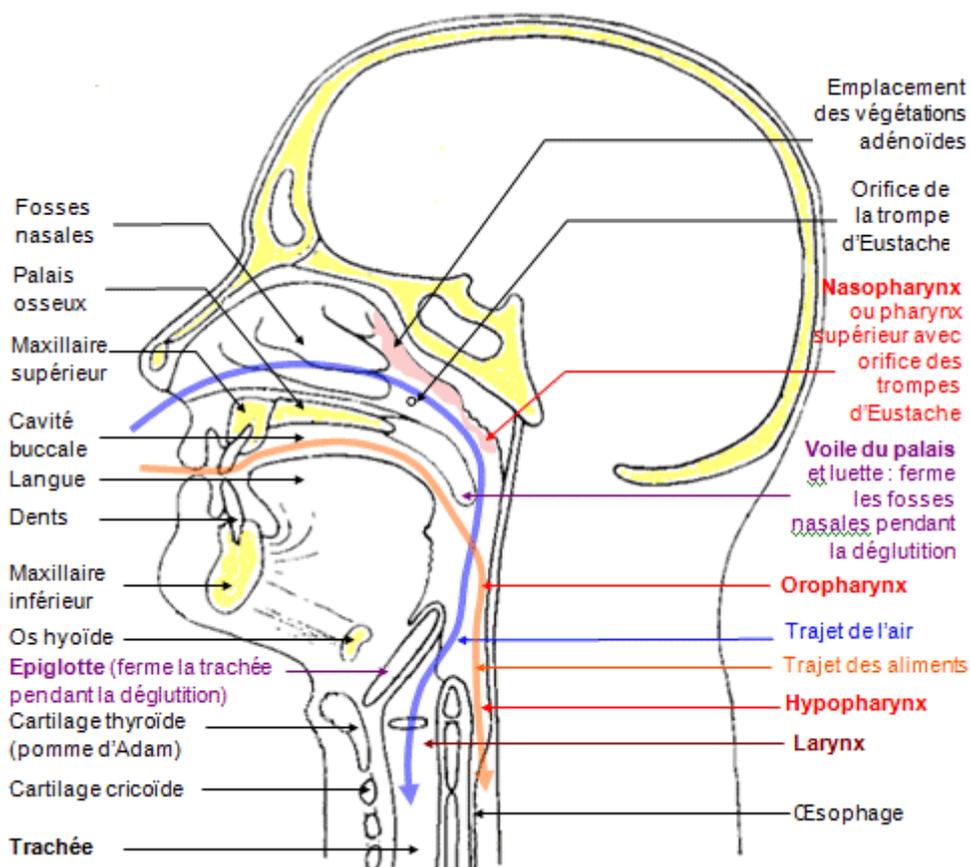


Figure 2 : Les voies aériennes supérieures (coupe sagittale médiane)

1.2.2. Les voies aériennes inférieures (intra-thoraciques)

Les bronches souches pénètrent chacune dans l'un des poumons par le hile. Les bronches se divisent, dans les poumons, en bronches de plus en plus étroites, jusqu'à devenir des bronchioles qui aboutissent aux lobules pulmonaires (volume de 1 cm³ environ). Un lobule est constitué d'une série de petits sacs : les alvéoles pulmonaires.

1.2.3. Les poumons

Protégés par les côtes, les poumons sont deux masses spongieuses, rosées, élastiques, entourées d'un double feuillet protecteur, la plèvre : un feuillet externe ou pariétal adhérant à la paroi thoracique et un feuillet interne ou viscéral qui adhère aux poumons (*Figure 3*). Entre ces feuillets, c'est le vide pleural assurant leur solidarité. On y trouve cependant un liquide lubrifiant permettant le glissement des feuillets pleuraux l'un sur l'autre pendant la ventilation. L'intégrité poumons-côtes-muscles est essentielle à la ventilation. Le hile par où pénètre la bronche souche et les vaisseaux pulmonaires est dépourvu de plèvre : c'est une zone de faiblesse. Le poumon droit est formé de 3 lobes, et le gauche seulement de 2, laissant ainsi la place au cœur. Entre les deux poumons se situe un espace : le médiastin, où cheminent la trachée et les vaisseaux issus du cœur.

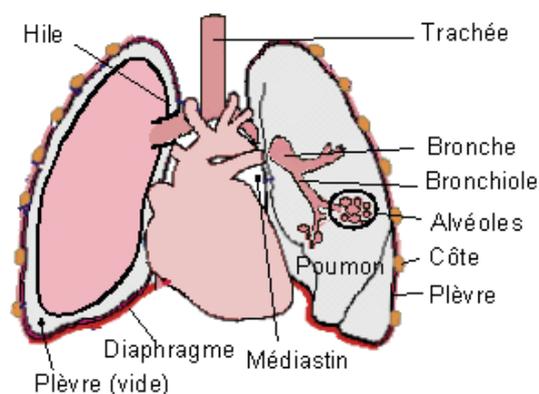


Figure 3 : Les poumons

1.2.4. Les alvéoles pulmonaires

Structure de base du poumon, siège des échanges gazeux (O₂, N₂, CO₂), les alvéoles pulmonaires sont de petits sacs où débouche l'air amené par les voies respiratoires. Leur paroi est élastique et tapissée de liquide et de surfactant. Le rôle de ce liquide est de dissoudre les gaz avant leur diffusion au travers des parois. Quant au surfactant, il est sécrété par certaines

cellules de la paroi alvéolaire, afin d'éviter que les alvéoles ne s'affaissent sur elles-mêmes lors d'une expiration forcée. Une alvéole mesure environ 0,2 mm ; les fibres de la paroi étant élastiques, le diamètre de celle-ci peut passer à 0,1 mm en cas d'expiration forcée et atteindre 0,3 à 0,5 mm lors d'une inspiration forcée. Les deux poumons comptent en moyenne 700 millions d'alvéoles. La surface de contact dans les alvéoles est d'environ 100 à 150 m² (chez l'homme, seulement les deux tiers des alvéoles sont fonctionnelles) et l'épaisseur de la paroi alvéolo-capillaire est inférieure à 1 micron. Les alvéoles sont en contact étroit avec les capillaires pulmonaires.

1.3. La muqueuse et l'épithélium respiratoire

La muqueuse respiratoire est composée d'un épithélium de type respiratoire reposant sur une membrane basale et d'un chorion conjonctif (*lamina propria*) constitué de fibres collagènes et élastiques, contenant des vaisseaux capillaires sanguins et lymphatiques. Les fibres élastiques permettent une certaine flexibilité et un retour à la normale après dilatation des bronches. Ce chorion peut également classiquement renfermer un tissu lymphoïde appelé MALT (Tissu Lymphoïde Associé aux Muqueuses) ; il se compose de lymphocytes dispersés ou regroupés en follicules lymphoïdes primaires ou secondaires. La structure de l'épithélium varie en fonction du diamètre des voies aériennes. Au niveau des bronches, l'épithélium respiratoire est pseudo-stratifié. Cette pseudo-stratification disparaît au niveau des bronchioles. L'épithélium est alors uni-stratifié, cylindrique puis cubique.

1.3.1. La structure de l'épithélium respiratoire

L'épithélium respiratoire est composé de 4 types de cellules (*Figure 4*) : les cellules ciliées, les cellules caliciformes, les cellules basales et les cellules neuroendocrines.

- Les *cellules ciliées* sont les plus abondantes. Ces cellules ciliées jouent un rôle fondamental dans l'épuration pulmonaire en assurant la clairance muco-ciliaire. Les cils (200-300/cellule) se situent au pôle apical, mesurent 5-7 mm de long et 0,25 mm de diamètre, et battent à une fréquence régulière de 10 à 20 battements par seconde. Le cytosquelette du cil est l'axonème, support du mouvement ciliaire. Entre les cils existent quelques microvillosités.

- Les *cellules caliciformes* (1 pour environ 5 cellules ciliées) ont un noyau refoulé vers la base par des vacuoles supra-nucléaires contenant du mucigène qui participe, avec les sécrétions des glandes séro-muqueuses, à la formation du mucus (10 à 20 ml/j). Celui-ci permet d'emprisonner les impuretés de l'air inspiré et d'absorber certains gaz (SO₂, ozone...)

et possède des propriétés rhéologiques et anti-bactériennes. Il se compose à 95 % d'eau et d'électrolytes, à 2 % de mucines, à 1 % de protéines, à 1 % de lipides et à 1 % de sels inorganiques. Les cellules ciliées persistent dans les bronches de petit calibre au delà des cellules caliciformes. Le nombre de cellules caliciformes augmente avec celui des impuretés dans l'air inspiré. Le nouveau-né en est dépourvu. A l'opposé, il existe une hyperplasie des cellules caliciformes chez les fumeurs.

- Les *cellules basales* sont des petites cellules situées dans la partie profonde de l'épithélium contre la membrane basale. Elles sont très importantes dans le renouvellement cellulaire (cellules de réserve) car elles sont capables de remplacer n'importe quel autre type de cellule bronchique.

- Les *cellules neuroendocrines* sont minoritaires (3 à 5 % des cellules épithéliales), elles sont visibles en microscopie électronique ou sur coupe histologique après un immunomarquage à l'aide de marqueurs neuro-endocrines (comme la chromogranine A, la Synaptophysine ou la sérotonine). Elles appartiennent au système APUD ou neuroendocrinien diffus. Ces cellules se groupent pour former des corps neuro-épithéliaux : chémorécepteurs capables de détecter les variations de teneur en O₂ ou CO₂ de l'air.



Figure 4 : Epithélium de type respiratoire

1.3.2. Les fonctions de l'épithélium respiratoire

L'épithélium respiratoire représente la première ligne de défense contre les agressions. Il constitue une barrière physique cohésive empêchant l'entrée dans l'organisme des corps étrangers contenus dans l'air. C'est le système muco-ciliaire associé à l'épithélium qui permet l'élimination des différents corps étrangers. L'épithélium joue également un rôle métabolique et immunitaire important. Il régule le transport ionique et produit des mucines et des défensines qui sont impliquées dans la réponse immunitaire innée. Par la production de certaines cytokines et chimiokines particulières, l'épithélium régule aussi la fonction immunitaire adaptative.

1.3.2.1. La fonction de barrière physique

La cohésion de la barrière épithéliale s'effectue par l'intermédiaire de plusieurs complexes jonctionnels intercellulaires comme les jonctions serrées, les jonctions intermédiaires, les desmosomes et les jonctions communicantes. L'épithélium est lui-même ancré à la membrane basale par des complexes multiprotéiques appelés hémidesmosomes (*Figure 5*).

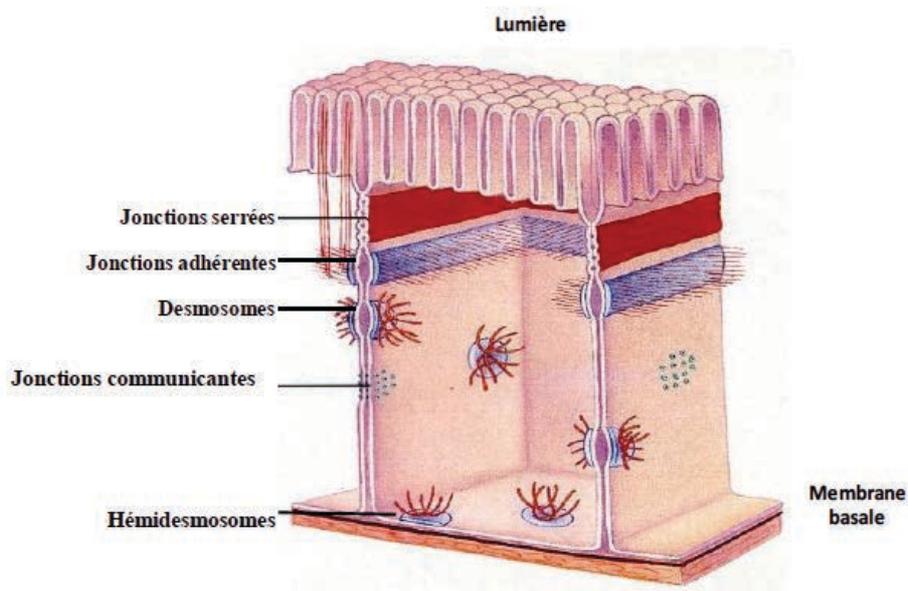


Figure 5 : Les différentes jonctions intercellulaires

1.3.2.2. La fonction de défense innée

a) *La clairance muco-ciliaire*

Elle peut être considérée comme le premier mécanisme de défense inné des voies aériennes (Knowles *et al.* 2002). Un mucus recouvre l'épithélium des voies aériennes ce qui permet de piéger les différents débris ou pathogènes présents dans l'air inhalé. Le battement coordonné des cils va ensuite permettre l'évacuation de ce mucus depuis les voies aériennes distales vers la trachée, et enfin vers le pharynx pour qu'il soit éliminé par la déglutition ou par la toux (Zahm *et al.* 1989). Le liquide recouvrant la surface de l'épithélium, est composé de glycoprotéines, de glycosaminoglycannes, de protéines, d'antiprotéases, d'antioxydants, d'eau et d'ions (King *et al.* 1999). Il se décompose en deux phases : une phase "sol" liquidienne, recouverte d'une phase "gel" ou mucus. La première, appelée aussi liquide péri-ciliaire est une phase aqueuse, aux propriétés lubrifiantes et de faible viscosité, où s'effectuent les battements ciliaires. En conditions physiologiques son épaisseur reste constante et est finement régulée par les transports ioniques trans-épithéliaux (Tarran 2004). Son rôle est d'éviter l'adhérence de certaines protéines membranaires, comme MUC-1 ou MUC-4, avec les protéines de la phase "gel" (Knowles *et al.* 2002). Le liquide péri-ciliaire joue également un rôle important vis-à-vis des peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules épithéliales. (Ganz 2002; Travis *et al.* 1999). La seconde phase dite "gel", est plus dense et localisée au-dessus de la première. Elle est composée d'eau, de protéines de lipides, de minéraux et d'ions. Ses caractéristiques de viscosité notamment influent sur son transport par les cils (King 1987). Le mucus est principalement composé de mucines dont MUC-5AC, MUC-5B (Thornton *et al.* 1996; Buisine *et al.* 1999) mais également en quantité inférieure de MUC-2 au niveau de l'épithélium bronchique (Vinall *et al.* 2000). Le mucus permet de piéger les particules et les pathogènes présents dans l'air en partie grâce à divers résidus sucrés au niveau de leurs chaînes glycaniques, créant des sites spécifiques d'adhérence pour une grande variété de pathogènes inhalés (Lamblin *et al.* 1991).

b) Le pouvoir antibiotique des cellules épithéliales

En dépit des différents mécanismes mis en place, certains pathogènes réussissent à se développer au niveau du poumon. Ceci est notamment lié à un temps long d'élimination du mucus. Pour pallier cela, de nombreuses substances antimicrobiennes (*Tableau 1*) sont sécrétées dans le liquide de surface afin de limiter la croissance bactérienne (Ganz 2002; Kaliner 1991).

1.4. Immunité de l'appareil respiratoire

1.4.1. Immunité innée du système respiratoire

L'immunité innée du système respiratoire permet de bloquer et d'éliminer les agents pathogènes ayant échappés aux premières lignes de défenses naturelles que sont les épithéliums. Elle est composée de cellules en circulation et de cellules dans les tissus telles que les monocytes/macrophages, les polynucléaires neutrophiles (PN), les cellules dendritiques (CD), les cellules natural killers (NK) et les mast cells (Brusselle *et al.* 2011). Dans le poumon, la seconde ligne de défense est le recrutement des PN et des macrophages (Barnes 2008). Leur rôle est de nettoyer le poumon des particules et pathogènes qui n'auraient pas été éliminés par le complexe épithélium/muco-ciliaire, et de résorber l'inflammation. Les PN sont notamment recrutés par les cellules épithéliales qui sécrètent de l'IL-8, puissant chimio-attractant des PN. Les PN vont recruter à leur tour les monocytes (Doherty *et al.* 1988). Arrivés au site inflammatoire et infectieux, les PN et les macrophages sécrètent de nombreuses molécules ou médiateurs de l'inflammation (*Tableau 1*) qui vont participer à l'élimination des agents pathogènes.

1.4.1.1. Les macrophages alvéolaires

Les macrophages alvéolaires représentent plus de 90% des cellules intra-alvéolaires chez le sujet sain. Ils jouent un rôle primordial dans les défenses anti-infectieuses grâce à leurs activités de phagocytose, la synthèse de peptides antimicrobiens, et leur capacité à reconnaître les agents infectieux induisant la synthèse de signaux activateurs de l'immunité innée et acquise (Sibille *et al.* 1990). Les macrophages peuvent avoir deux types de comportements en cas d'agression par des agents infectieux (Moore *et al.* 2001) :

- L'inoculum est faible ou l'agent infectieux peu virulent : la phagocytose des macrophages suffit à contrôler l'infection. Ce phénomène survient sans déclencher de réaction inflammatoire, soulignant le fait que le milieu alvéolaire est physiologiquement contrôlé par un ensemble de signaux immunosuppresseurs qui prévient la survenue d'une réaction inflammatoire inappropriée pouvant s'avérer dommageable à la qualité des échanges gazeux en cas d'inhalation de particules non pathogènes. Ces signaux sont encore mal connus et résultent en particulier de l'action des lipides du surfactant (McCormack *et al.* 2002).

- L'inoculum est plus important ou l'agent infectieux possède des facteurs de virulence lui

permettant d'échapper aux systèmes d'exclusion et à la bactériolyse : les macrophages synthétisent des médiateurs qui permettent de mettre en jeu et d'activer d'autres populations cellulaires de l'immunité innée. Ces signaux intercellulaires sont les cytokines de la phase aiguë de l'inflammation (IL-1 α , β , IL-6...), les chimiokines (IL-8) et les métabolites de l'acide arachidonique (leucotriènes B4) qui initient la réponse inflammatoire et recrutent les PN et les monocytes/macrophages. Le TNF- α et l'IL1- β favorisent également le recrutement des PN en augmentant l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales, permettant le "rolling" puis l'adhésion ferme de ces phagocytes professionnels (P- et E-sélectine, ICAM-1,...) à la paroi des vaisseaux pulmonaires (Ward 1997).

1.4.1.2. Les autres cellules impliquées dans l'immunité innée

Le principal rôle des polynucléaires neutrophiles est l'élimination des agents pathogènes par phagocytose, leur efficacité bactériolytique est supérieure à celle des macrophages (Sibille *et al.* 1990). Quasiment absents de la lumière alvéolaire à l'état normal (Cohen *et al.* 1983), ils sont recrutés très rapidement et peuvent représenter la quasi-totalité des cellules alvéolaires lors des infections respiratoires bactériennes ou lors d'instillation trachéale de LPS chez l'animal (Nelson *et al.* 1989) en réponse à la production locale de facteurs chimiotactiques et à la surexpression des molécules d'adhésion vasculaires. Les PN recrutés acquièrent une activité bactéricide optimale sous l'influence de signaux activateurs comme le G-CSF, le TNF- α , l'IL-8 et le MIP-2. Les PN jouent également un rôle dans la régulation de l'inflammation par la production de cytokines pro-inflammatoires : TNF- α , IL-1 β , IL-6 et MIP-2 (Xing *et al.* 1994). À ce titre, ils sont impliqués dans la survenue du syndrome de détresse respiratoire de l'adulte (Kanazawa *et al.* 1992). Après avoir rempli leur fonction, les PN deviennent apoptotiques et sont éliminés par les macrophages alvéolaires, prévenant ainsi le relargage des radicaux libres et des enzymes protéolytiques qu'ils contiennent (Cox *et al.* 1995).

Les cellules NK jouent un rôle important dans la lyse et l'induction de l'apoptose des cellules infectées par les bactéries intracellulaires et les virus. Cette lyse est anticorps-indépendante. L'activité antivirale des cellules NK est également liée à leur capacité de synthèse d'IFN- γ (Moore *et al.* 2001).

1.4.1.3. Système de reconnaissance inné des agents infectieux

La reconnaissance par les macrophages alvéolaires d'un agent infectieux repose sur l'existence d'un ensemble de récepteurs regroupés sous l'appellation de PRR pour *pattern recognition receptors*. Les PRR sont synthétisés de manière constitutive et caractérisés par leur capacité à reconnaître des signatures moléculaires présentes sur les agents pathogènes, les PAMP pour *pathogen associated molecular patterns* (Medzhitov 2001). C'est le cas, par exemple, des bactéries à Gram négatif, du peptidoglycane de la paroi bactérienne, de l'ADN bactérien, et de l'ARN double brin de certains virus (*Tableau 2*). Ces molécules sont absentes des cellules de l'hôte. À la différence des antigènes reconnus par l'immunité spécifique acquise, les PAMP ne sont pas spécifiques d'une espèce ou d'un genre de microorganisme (Medzhitov 2001; Anderson 2000). En fonction de leur mode d'action, les PRR peuvent être classés en trois groupes :

- Les PRR sécrétés qui neutralisent les agents pathogènes par activation du complément ou facilitation de la phagocytose
- Les PRR membranaires des macrophages, médiateurs de la phagocytose
- Les PRR induisant un signal intracellulaire (PRR de transduction) tels que les Toll-like récepteurs (*Tableau 2*).

Molécules	Cible/mode d'action	Origine
Polypeptides anti-microbiens		
Lysozyme	Paroi bactérienne : lyse du peptidoglycane	Épithélium, PN, Monocytes
Lactoferrine	Captation du fer	Épithélium, et PN
Transferrine	Activité bactéricide propre Captation du fer	Source extra pulmonaire
Phospholipase A2 et Bacterial permeability-inducing protein (BPI)	Lyse des phospholipides membranaires	Épithélium, PN PN
Secretory leucoprotease inhibitor (SLPI)	Activité modeste (Gram + et Gram -)	Épithélium, MP
Défensines et cathélicidines (LL-37)	Destruction de la membrane cytoplasmique des bactéries, des levures, des champignons et des virus enveloppés	PN Épithélium
Collectines Surfactant protein A et D (SP-A, SP-D)	Opsonisation* Phagocytose Burst oxydatif des PNN Modulation de la production de cytokines	Pneumocytes de type II
Autres protéines à activité anti-microbienne		
IgA IgG	Neutralisation des toxines et des virus Neutralisation Opsonisation bactérienne, Phagocytose Activation du complément	Lymphocytes B et plasmocytes
Complément	Opsonisation Lyse des membranes bactériennes et des levures par formation du complexe d'attaque membranaire Phagocytose Chémotactisme des PNN	MP Pneumocytes de type II Fibroblastes
Fibronectine	Opsonisation Phagocytose Inhibition de l'adhérence bactérienne Chémotactisme des PNN Production de cytokines	MP Fibroblastes Cellules épithéliales
PN : Polynucléaires neutrophiles ; MP : macrophages pulmonaires		

Tableau 1 : Molécules à activité antimicrobienne présentes dans l'arbre respiratoire
(d'après <http://www.respir.com/DefensesAntiInfectieusesAppRespiratoire.asp>)

PRR	Protéine, domaine d'activité biologique ou famille	Ligands (PAMP)	Fonction
PRR sécrétés (opsonines)			
Mannan binding protein	Lectine de type C	Résidu mannose terminal	Activation du complément
CRP, SAP	Pentraxines	Phosphorylcholine bactérienne	Opsonisation, activation de la voie classique du complément
LPS binding protein (LBP)	Protéine de transfert lipidique	LPS	Reconnaissance du LPS
PRR membranaires des macrophages médiateurs de l'endocytose			
CD14	Répétition riches en Leucine	LPS, peptidoglycane Résidus mannose	Corécepteur des TLR Phagocytose
Récepteur du mannose Scavenger récepteur	Lectine de type C Domaine riche en cystéine	LPS, ADN double brin, Polymères anioniques LDL	Phagocytose, clearance du LPS, métabolisme des lipides
MARCO	Domaine riche en cystéine	Paroi bactérienne	Phagocytose
Toll-like récepteurs	Répétition riches en Leucine	variés	Transduction de signaux intracellulaires
PRR membranaires engendrant un signal intracellulaire			
PKR	Dom. ARN double brin (virus) Dom. protéine kinase	ARN double brin	Activation de NF- κ B et des MAP kinases, induction de l'apoptose des cellules infectées par les virus Activation de NF- κ B
NOD	Répétition riches en Leucine, domaine de liaison aux nucléotides, domaine de recrutement des caspases (CARD)	NOD1 et NOD2 : LPS	Induction de l'apoptose
Toll-like récepteurs	Répétition riches en Leucine	variés	Transduction de signaux intracellulaires (activation de NF- κ B)

Tableau 2 : PRR et PAMP du système de défense anti-infectieuse pulmonaire
(d'après <http://www.respir.com/DefensesAntiInfectieusesAppRespiratoire.asp>)

1.4.2. Immunité acquise du système respiratoire

Au niveau pulmonaire, l'immunité acquise est particulièrement indispensable pour lutter contre certains microorganismes virulents lorsqu'ils échappent au contrôle de l'immunité innée. C'est le cas des infections à bactéries capsulées (pneumocoque, *Haemophilus b*), des infections à germe à multiplication intracellulaire (légionelles, chlamydiae, mycobactéries) et des infections virales (Reynolds 2002).

1.4.2.1. Initiation de la réponse immunitaire spécifique

Chez l'homme, les lymphocytes de l'arbre trachéo-bronchique sont majoritairement présents au sein des structures ganglionnaires et donc à distance des foyers infectieux. Les cellules dendritiques et les cellules de Langerhans pulmonaires jouent un rôle d'initiation et de développement de l'immunité acquise de deux manières (Moore *et al.* 2001; Lambrecht *et al.* 2001). Elles phagocytent l'agent pathogène, élaborent, transportent et présentent les peptides antigéniques aux lymphocytes, et orientent le type de réponse immune développée en fonction de la production de différentes cytokines immuno-modulatrices. D'une manière générale, les cytokines immuno-modulatrices peuvent être classées en deux groupes à activités opposées (*Tableau 3*) (Mosmann *et al.* 1986). Les cytokines Th-1 sont impliquées dans l'activation des macrophages et des PN et orientent vers une réaction immunitaire spécifique de type cellulaire. A l'inverse, les cytokines Th-2 inhibent une grande variété de fonctions de l'immunité innée incluant l'activité des macrophages et des PN et orientent vers une réponse immune humorale. L'équilibre entre les cytokines Th-1 et Th-2, produites lors de l'inflammation, va permettre deux types d'action ; la modulation de l'intensité de la réponse innée et l'orientation du type de réponse immune acquise. Comme d'autres types cellulaires, les cellules dendritiques peuvent produire ces deux types de cytokines lors de la présentation de l'antigène, en particulier l'IL-12 (phénotype Th-1) et l'IL-10 (phénotype Th-2), induisant la différenciation des lymphocytes T (LT) CD4⁺ en deux sous populations à actions opposées.

1.4.2.2. Réponse immune spécifique liée aux lymphocytes T

Les lymphocytes T CD4⁺ de type Th-1 sont impliqués dans l'immunité acquise à médiation cellulaire (hypersensibilité retardée), dans la réponse aux bactéries intracellulaires et aux virus. Ils augmentent l'activité bactéricide des macrophages, activent les cellules T cytotoxiques, et favorisent la synthèse des immunoglobulines IgG_{2a} par les lymphocytes B.

Les lymphocytes T CD4⁺ de type Th-2 activent les mastocytes et les éosinophiles (réponse antiparasitaire) et induisent la maturation des lymphocytes B vers une réponse humorale de type IgG1-IgG3 et la production d'IgA et d'IgE (Moore *et al.* 2001). *In vivo*, il a été montré que la fréquence relative des sous-populations lymphocytaires T CD4⁺ Th-1 et Th-2 jouait un rôle crucial dans l'évolution de l'infection. Par exemple, une réponse de type Th-1 est nécessaire pour l'évolution favorable de l'infection à *Leishmania* (Kemp *et al.* 1994), et de manière plus générale, semble cruciale dans le cadre des infections à germes intracellulaires. Chez un individu donné, le développement des sous-populations lymphocytaires Th-1 et Th-2 dépend à la fois de l'agent pathogène, du site infecté mais aussi du terrain génétique de l'hôte et de son histoire immunitaire. Ces éléments expliquent probablement en partie la variabilité de la susceptibilité individuelle aux agents infectieux (Moore *et al.* 2001). Le rôle des lymphocytes T spécifiques CD8⁺ cytotoxiques a été démontré dans les infections à virus, à *Toxoplasma gondii*, à *Listeria monocytogenes*, à *Leishmania major*, à *Cryptococcus neoformans* et dans les infections à mycobactéries (Kemp *et al.* 1994; Koguchi *et al.* 2002; Smith *et al.* 2000; Denkers *et al.* 1993; Edelson *et al.* 2000).

1.4.2.3. Immunité acquise humorale : immunoglobulines spécifiques

Les immunoglobulines spécifiques font partie des défenses acquises et agissent soit par mécanisme d'exclusion en empêchant l'adhérence aux cellules épithéliales, soit par opsonisation, permettant une activation du complément par la voie classique et favorisant la phagocytose. Les IgA et les IgG sont les principales immunoglobulines présentes dans la lumière de l'arbre trachéo-bronchique (Lusuardi *et al.* 2002). La synthèse des immunoglobulines est assurée par les plasmocytes présents dans la *lamina propria* de l'épithélium bronchique. Ils fabriquent les chaînes lourdes et les chaînes légères des immunoglobulines ainsi que la pièce de jonction. Les IgA s'assemblent à la pièce de jonction sous forme dimérique alors que les IgM s'assemblent sous forme pentamérique. Elles traversent l'épithélium par diffusion ainsi qu'une faible proportion d'IgG, IgD et IgE (Lusuardi M *et al.* 2002). Les lymphocytes B matures peuvent être activés directement lorsqu'ils rencontrent un antigène présent dans le milieu extérieur par interaction directe avec le récepteur des cellules B (BCR). Ce mécanisme est dit T indépendant (indépendant des lymphocytes T). Les antigènes T indépendants sont des structures répétitives faisant en général partie de la paroi des bactéries : LPS, lipoprotéines, capsules polysaccharidiques (*S. pneumoniae*, *H. influenzae B*), peptidoglycanes et porines. Les immunoglobulines produites en réponse aux antigènes polysaccharidiques sont presque uniquement de type IgG₂. La

réponse humorale vis-à-vis des antigènes protéiques (toxines, protéines de membrane externe, protéines virales) nécessite une coopération cellulaire entre les lymphocytes T CD4⁺, les cellules présentatrices de l'antigène et les lymphocytes B. Les immunoglobulines produites en réponse à ces antigènes dits "T dépendants" sont le plus souvent des IgA, IgG1 et IgG3 (Lusuardi M *et al.* 2002).

1.4.2.4. Particularité de l'immunité anti-bactérienne et anti-virale

a) *Les infections bactériennes*

L'efficacité des défenses de l'hôte contre les bactéries à multiplication extracellulaire dépend principalement de la rapidité de leur élimination par phagocytose. Les types cellulaires impliqués dans ce phénomène sont les macrophages résidents et les cellules recrutées lors de la réaction inflammatoire non spécifique : PN et monocytes/macrophages. La réponse immunitaire contre les bactéries à multiplication intracellulaire requiert à la fois l'activation des cellules phagocytaires (rôle de l'IFN- γ , cytokine Th-1), des cellules cytotoxiques de l'immunité innée (cellules NK, Lymphocytes T $\gamma\delta$ (Moore *et al.* 2001; Hayday *et al.* 2000) et de l'acquisition d'une immunité spécifique. Citons pour exemple le cas des infections à mycobactéries (Serbina *et al.* 2001; Stenger 2001; Sharma *et al.* 2001) où l'efficacité de l'immunité innée dépend principalement des macrophages activés par l'IFN- γ puis de la mise en jeu des lymphocytes cytotoxiques T CD8⁺ qui lysent les cellules infectées. La formation du granulome qui contient de nombreuses cellules dendritiques reflète l'inefficacité de l'organisme à développer une immunité innée efficace et la nécessité d'isoler le foyer infectieux de manière à prévenir son extension.

b) *Les infections virales*

L'immunité innée anti-virale dépend de la synthèse des IFN de type I (alpha et bêta) qui bloque la traduction des protéines virales. Ils augmentent l'expression des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I à la surface des cellules infectées, permettant leur lyse et l'acquisition d'une mémoire immunitaire par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques, et activent les cellules NK (Moore *et al.* 2001). La réponse immunitaire antivirale requiert également l'activation du système phagocytaire et des cellules NK, et l'action de l'immunité acquise humorale et cellulaire médiée par les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques spécifiques (Moore *et al.* 2001; Doherty *et al.* 1988). L'activation des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques nécessite une présentation antigénique par des cellules

dendritiques infectées (McWilliam *et al.* 1997; Hamilton-Easton *et al.* 1995) ou ayant phagocyté des cellules épithéliales infectées apoptotiques (Albert *et al.* 1998).

1.5. La ventilation au niveau de l'appareil respiratoire

1.5.1. La mécanique ventilatoire

Les changements de volume de la cage thoracique permettent la circulation et le renouvellement de l'air à l'intérieur des poumons. L'inspiration est due à l'augmentation du volume de la cage thoracique, ce qui entraîne une dépression et un appel d'air dans les poumons. Des muscles vont intervenir dans cette phase inspiratoire. Le muscle inspiratoire principal est le diaphragme, muscle plat séparant le thorax de l'abdomen. Il assure à lui seul la mobilisation des trois-quarts environ de l'air inspiré lors d'une respiration de repos. Sa contraction permet un élargissement du thorax dans ses trois dimensions et favorise la ventilation de la partie basse des poumons. Les autres muscles inspiratoires sont les intercostaux, le petit dentelé, les scalènes. Ils permettent plutôt une ventilation thoracique haute, moins efficace. Pour une inspiration forcée entrent en jeu les muscles inspiratoires accessoires: pectoral, trapèze et sterno-cléido mastoïdiens (muscles du cou). L'inspiration est une phase active. A l'inverse, l'expiration normale est liée au simple relâchement des muscles inspiratoires. L'élasticité de la cage thoracique et des poumons ramène l'ensemble à sa position initiale. L'expiration est une phase passive pour un individu au repos. Elle devient active pour la respiration à l'effort et l'expiration forcée où les abdominaux se contractent et jouent un rôle actif.

1.5.2. Les volumes pulmonaires

- Le volume courant (VC)

Au cours de la respiration calme, chez un sujet au repos, un volume d'air d'environ 0,5 litre est inspiré et expiré à chaque mouvement : c'est le volume courant.

- Le volume de réserve inspiratoire (VRI)

Après une inspiration calme, c'est le volume de l'air inspiré en supplément grâce à une inspiration forcée. Il est de 2,5 litres en moyenne, mais est très variable suivant l'âge, la taille, le sexe et l'état physiologique de l'individu.

- Le volume de réserve expiratoire (VRE)

C'est le volume d'air supplémentaire expiré après une expiration calme, grâce à une expiration forcée. Il est d'environ 1,5 litre, et variable selon les individus. L'expiration forcée est notamment pratiquée par un sportif avant ou après un effort physique important. Elle permet l'élimination rapide du gaz carbonique.

- Le volume d'air résiduel (VR)

Après l'expiration forcée, il reste encore dans les poumons une certaine quantité de gaz que l'on ne peut expirer : c'est le volume résiduel. Il est d'environ 1 litre, lui aussi variable selon les individus.

- La capacité vitale (CV)

C'est la somme des volumes de gaz expiré après une expiration forcée qui a été précédée d'une inspiration forcée, soit :

Volume courant	0,5 litres
+ Volume de réserve inspiratoire	2,5 litres
+ Volume de réserve expiratoire	1,5 litres
Capacité vitale	4,5 litres

- La capacité totale (CT)

C'est la somme du volume de la capacité vitale et du volume résiduel, soit :

Capacité vitale	4,5 litres
+ Volume résiduel	1 litre
Capacité totale	5,5 litres en moyenne

- L'espace mort anatomique

L'espace mort anatomique représente le volume d'air qui ne participe pas aux échanges gazeux, car situé en dehors des alvéoles (nez, bouche, pharynx, trachée...). Il représente environ 150 ml chez l'adulte. Cela signifie que, lors d'une inspiration de 500 ml, seulement 350 ml participent aux échanges alvéolaires. Le rôle de l'espace mort est cependant fondamental : par effet « tampon », il permet la dilution de l'air extérieur. La conséquence essentielle est un taux constant des différents gaz au niveau des alvéoles. Les échanges se feront donc en continu.

1.5.3. Les débits ventilatoires

La fréquence respiratoire est d'environ 15 à 20 cycles/min et varie en fonction de l'âge, la taille et l'effort. Au repos, le débit est de 7 à 10 l/min. En plongée, on considère plutôt des chiffres de l'ordre de 15 à 20 l/min. A l'effort, par l'augmentation de la cadence et de l'amplitude des mouvements ventilatoires, ces débits peuvent atteindre 100 à 120 l/min chez des sujets non entraînés et jusqu'à 250 l/min chez certains athlètes lors d'efforts intenses.

1.5.4. Régulation de la fonction respiratoire

La régulation de cette fonction essentielle est d'origine nerveuse, sous la dépendance du centre respiratoire situé dans le bulbe rachidien.

- Automatisme du centre respiratoire

Les mouvements alternés de la respiration sont dus à l'activité périodique et rythmée du centre respiratoire. On parle d'auto-rythmicité (12 à 15 par minute au repos chez l'adulte) assurant le débit minimum nécessaire au maintien des fonctions vitales au repos, en mobilisant simplement le volume courant.

- Adaptation automatique

Les différentes conditions ambiantes (effort, lutte contre le froid, fièvre, déficit en O₂ ou excès de CO₂, ...) imposent une adaptation de l'approvisionnement en O₂ et du rejet de CO₂. Des capteurs, situés directement dans le centre respiratoire ou répartis dans l'organisme, transmettent au centre respiratoire les informations relatives aux grandeurs vitales : température corporelle (thermorécepteurs cutanés), pression artérielle (Pp) (barorécepteurs), Pp O₂ / Pp CO₂ / pH sanguin (chémo-récepteurs), taux des hormones (adrénaline, etc.). Ces mesures, comparées à des valeurs de référence, vont entraîner une réaction d'adaptation de la ventilation en agissant d'abord sur le rythme du cycle respiratoire puis, ensuite, sur son amplitude.

2. La BPCO

2.1. Généralités

La BPCO est une pathologie pulmonaire complexe caractérisée par une détérioration progressive et non réversible des voies aériennes. Actuellement, plus de 200 millions de personnes dans le monde en sont affectées, faisant de cette pathologie la quatrième cause mondiale de mortalité. La BPCO devrait devenir la troisième cause de mortalité à l'horizon 2020. Elle est la première cause de décès de patients atteints de pathologies pulmonaires (Croxtton *et al.* 2003; Lopez *et al.* 2006; Lopez *et al.* 1998). En Europe, le coût engendré par les maladies pulmonaires représente 6% du coût total des dépenses de santé dont 56% sont directement liés à la BPCO (représentant un montant d'environ 40 milliards d'euros). Les dépenses engendrées font de cette pathologie un problème majeur de santé publique.

2.2. Définition et classification

La BPCO est caractérisée par une diminution progressive et irréversible des capacités respiratoires associée à une réponse inflammatoire chronique. Elle inclut des bronchites chroniques qui engendrent des fibroses et une obstruction des petites voies aériennes, et l'emphysème caractérisé par une augmentation de la taille des alvéoles pulmonaires du fait de la destruction du parenchyme et de la matrice extracellulaire pulmonaire (*Figure 6*).

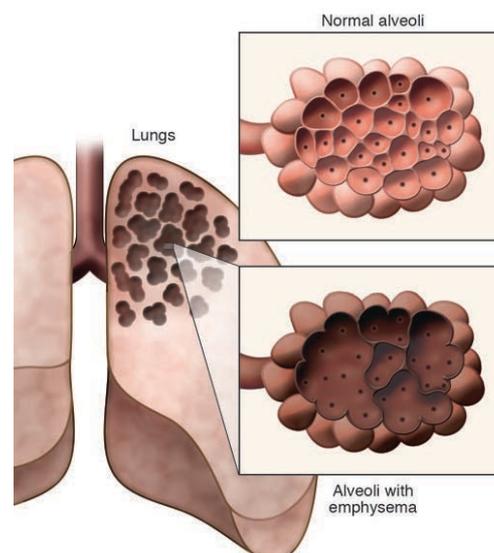


Figure 6 : Représentation d'alvéoles emphysémateuses
(d'après Taraseviciene-Stewart *et al.*, 2005)

L'emphysème est la forme la plus répandue de la BPCO. D'un point de vue symptomatique, elle est diagnostiquée par des dyspnées d'effort. Une toux et des expectorations chroniques permettent de constater la présence de bronchites chroniques. On estime qu'environ 80% des BPCO sont causées par le tabac dans les pays industrialisés, et que 20% des fumeurs vont développer une BPCO. Les autres agents étiologiques sont des polluants environnementaux ou des facteurs génétiques comme la déficience en $\alpha 1$ antitrypsine (Sethi and Rochester 2000). La BPCO est également une maladie liée à l'âge. Elle survient quasi-exclusivement après 40 ans. Les rares cas de BPCO se déclarant avant 40 ans sont liés à des anomalies génétiques.

Le terme de BCPO est général et recouvre différentes atteintes. Une classification, reposant sur la sévérité de la maladie, permet de classer les patients BPCO en quatre catégories nommées GOLD (Global initiative for Chronic-Obstructive Lung Disease). Ces catégories sont corrélées à la sévérité de la pathologie et vont de GOLD 1 pour une pathologie modérée à GOLD 4 pour une pathologie sévère (Hogg *et al.* 2004; Curtis *et al.* 2007). Les sujets n'ayant aucun problème pulmonaire peuvent être classés dans une catégorie à part nommée GOLD 0. Plusieurs critères sont retenus afin de définir la sévérité de la pathologie : *i*) le volume expiratoire forcé (FEV) que peut produire le patient et son rapport à la capacité vitale forcée (FVC), aussi appelé indice de Tiffeneau, *ii*) la résistance pulmonaire qui évalue les facteurs mécaniques limitant l'accès de l'air inspiré aux alvéoles pulmonaires, et *iii*) la compliance pulmonaire qui représente la capacité des poumons à modifier leur volume pour répondre à une pression qui leur est appliquée. L'indice de Tiffeneau et la FEV sont obtenus par des tests spirométriques et restent les critères les plus couramment utilisés en diagnostic de routine pour évaluer l'occurrence d'une BPCO ou une potentielle aggravation de la pathologie (Curtis, Freeman, and Hogg 2007) (*Tableau 3*).

Stage I : mild	FEV ₁ /FVC < 0.70 FEV ₁ ≥ 80% predicted
Stage II : moderate	FEV ₁ /FVC < 0.70 50% ≤ FEV ₁ < 80% predicted
Stage III : Severe	FEV ₁ /FVC < 0.70 30% ≤ FEV ₁ < 50% predicted
Stage IV : very severe	FEV ₁ /FVC < 0.70 FEV ₁ < 30% predicted or FEV ₁ < 50% predicted plus chronic respiratory failure

Tableau 3 : Classification spirométrique de la sévérité de la BPCO

Le premier stade de la classification est défini par une limitation respiratoire faible. Une

toux n'est pas forcément présente et les patients ne sont généralement pas conscients du trouble respiratoire dont ils sont atteints. Le second stade se caractérise par une détérioration des capacités pulmonaires, avec une toux ponctuelle et des difficultés respiratoires à l'effort. Au troisième stade, les capacités respiratoires sont très diminuées. Elles sont associées à une diminution des capacités physiques et à une qualité de vie des patients altérée. Le dernier stade associe des capacités pulmonaires extrêmement limitées, des effets délétères en dehors de la sphère pulmonaire et une qualité de vie excessivement détériorée. A ce stade, les périodes d'exacerbation de la pathologie peuvent devenir une menace pour la vie du patient (Rabe *et al.* 2007). Les phases d'exacerbation sont la conséquence, dans 80% des cas, d'une infection bactérienne ou virale.

2.3. Physiopathologie de la BPCO

2.3.1. BPCO et réponse inflammatoire

2.3.1.1. Implication des cellules inflammatoires de l'immunité innée

La BPCO est caractérisée par un état inflammatoire chronique au niveau pulmonaire mais dont l'origine est systémique. Ceci explique les effets délétères extra-pulmonaires observés au cours de la pathologie (Brusselle *et al.* 2011; O'byrne *et al.* 1999). L'inflammation des voies aériennes est la conséquence d'une infiltration massive du poumon par les cellules inflammatoires et immunitaires. Ainsi, un nombre important de macrophages est retrouvé dans le parenchyme pulmonaire, dans les lavages broncho-alvéolaires (LBA) et dans les expectorations de patients atteints de BPCO. Ce nombre est multiplié par 25 chez les fumeurs BPCO comparés aux fumeurs non BPCO (Retamales *et al.* 2001). On retrouve également un afflux important de PN dans les LBA, les expectorations et dans la *lamina* des artères pulmonaires des patients BPCO où leur présence est un marqueur d'aggravation de la pathologie. En revanche, les PN sont peu présents dans le parenchyme pulmonaire (Finkelstein *et al.* 1995). Le nombre de PN dans les LBA de patients atteints de BPCO est associé au degré de sévérité de la maladie (Barnes 2000), et le recrutement des PN dans le tissu pulmonaire est directement corrélé à la progression de l'emphysème (Abraham *et al.* 2000). L'infiltrat neutrophilique qui est présent dans les poumons de patients BPCO à l'état stable est majoré au cours des épisodes d'exacerbations (Barnes PJ., 2004). Le recrutement de

ces PN est sous le contrôle de médiateurs chimiotactiques tels que l'IL-8, GRO- α ou RANTES (Pan *et al.* 2000) mais également de peptides issus de la dégradation de la matrice extracellulaire et en particulier du collagène et de l'élastine (Chang *et al.* 1970; Laskin *et al.* 1986). Le rôle bénéfique des PN au cours de la BPCO et en particulier aux cours des exacerbations (élimination des agents pathogènes) est limité (Hirai *et al.* 1997; Macedo *et al.* 2010) du fait de la capacité des ces cellules à sécréter des quantités importantes de protéases et en particulier de NE qui participe à la destruction du tissu conjonctif du parenchyme pulmonaire et à la dégradation de l'élastine. Les PN produisent également des MMP-2 et 9 dont l'activité élastinolytique renforce le rôle délétère des PN au cours de la BPCO (Faurischou *et al.* 2003).

2.3.1.2. Implication des cellules de l'immunité adaptative

Les patients atteints de BPCO ont une infiltration importante du parenchyme pulmonaire par des lymphocytes T CD8⁺ organisés en follicules lymphoïdes. Les lymphocytes T CD8⁺ représentent la population lymphocytaire T majoritairement présente dans le tissu alvéolaire et dans les artères pulmonaires (MacNee 2005; Lusuardi *et al.* 2002; Banerjee *et al.* 2004; Cosio *et al.* 2009). Dans le parenchyme pulmonaire au sens large, les lymphocytes T CD4⁺ sont majoritairement de type Th-1. Par ailleurs, les patients BPCO ont un nombre élevé de CD immatures dans leurs expectorations (Tsoumakidou *et al.* 2008; Demedts *et al.* 2007) ce qui indique une forte capacité de présentation d'antigènes dans le tissu pulmonaire au cours de la pathologie (Tsoumakidou *et al.* 2008). Les cellules dendritiques sont également retrouvées en grand nombre à la surface des épithéliums bronchiolaires et alvéolaires ainsi que dans le parenchyme pulmonaire de patients BPCO (Lommatzsch *et al.* 2010; Freeman *et al.* 2009; Casolaro *et al.* 1988). En outre, la présence chez les patients atteints de BPCO d'auto-anticorps circulants dirigés contre l'élastine et d'autres composants de la matrice extracellulaire indique l'existence d'une composante auto-immune au cours de la pathologie et la potentialité des CD à présenter des antigènes du "soi" au cours de la maladie. L'existence d'une rupture de la tolérance et d'une composante auto-immune au cours de la BPCO est conforté par l'existence d'un modèle auto-immun d'emphysème chez le rat (Taraseviciene-Stewart *et al.* 2005) et par l'altération de la fonction des lymphocytes T régulateurs chez les patients BPCO.

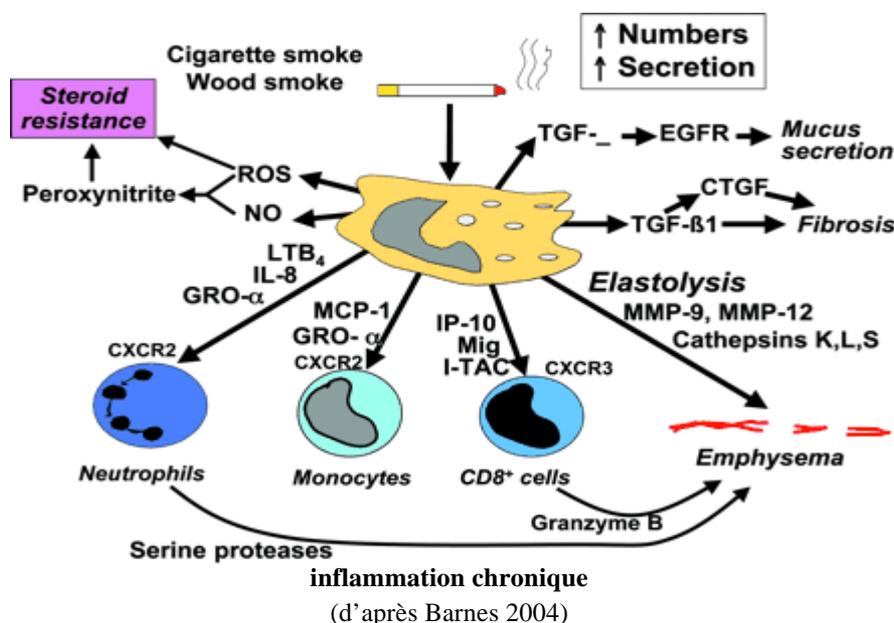
2.3.1.3. Implication des médiateurs de l'inflammation

De nombreux médiateurs de l'inflammation sont également retrouvés dans les différents fluides des patients BPCO. C'est le cas de l'IL-6, du TNF- α , des leucotriènes B4 ou encore de la C-Reactive Protein (CRP) (Barnes 2003; Gompertz *et al.* 2001; Crooks *et al.* 2000; Aaron *et al.* 2001). Les taux d'IL-6 et de TNF- α corréleront avec la sévérité de la pathologie (Chung 2001; de Torres *et al.* 2008). En cas d'exacerbation, l'inflammation systémique s'aggrave avec une élévation des taux d'IL-6, d'IP-10 et de TNF- α au niveau circulant (Donaldson *et al.* 2002; Gan 2004; Pinto-Plata *et al.* 2007). Les protéases augmentent également au cours de la BPCO. En effet, l'activation des cellules inflammatoires au cours de la BPCO conduit à la sécrétion de nombreuses protéases telles que des sérines protéases spécifiques du PN (Elastase du PN (NE), cathepsine G, protéinase 3), des cystéines protéinases (caspases 3/9, cathepsines K, L, S et V) et des métallo-protéinases matricielles (MMP 2,7,9 et 12) (Shapiro 1994). Ces protéases participent à l'installation et à l'entretien de la réponse inflammatoire chronique ainsi qu'à la genèse des lésions tissulaires observées au cours la pathologie. De façon plus focalisée, l'augmentation des sérines protéases et en particulier de la NE est associée à l'intensité des lésions emphysémateuses. Par ailleurs, les sujets déficients en l'inhibiteur naturel de NE, l'alpha-1 anti-trypsine, développent un emphysème pulmonaire précoce et sévère (Sandford *et al.* 1997). A l'opposé, des souris déficientes en NE et exposées à la fumée de cigarette sont en partie protégées contre le développement d'un emphysème contrairement aux souris sauvages (Shapiro *et al.* 2003). La dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) par les différentes protéases va également aboutir à la libération de nombreuses matrikines retrouvés en grandes quantités dans les LBA au cours de la BPCO (Fülöp *et al.* 1990; Frances *et al.* 1984; Hornebeck *et al.* 1984). Ces matrikines vont exercer des effets biologiques divers et variés dépendant à la fois de la séquence du peptide généré, mais aussi du type cellulaire sur lequel il se fixe (Rodgers *et al.* 2005). Ces matrikines vont notamment avoir un rôle de molécules chimio-attractantes vis-à-vis des PN et des monocytes (Houghton 2006).

2.3.1.4. BPCO, inflammation chronique et exacerbation

L'ensemble des évènements physiopathologiques décrits ci-dessus conduit à l'installation d'un mécanisme inflammatoire chronique (*Figure 7*) qui génère des manifestations cliniques difficilement réversibles (Grumelli *et al.* 2004) même après l'arrêt du tabac. Ainsi, la fibrose qui se développe au niveau des petites voies aériennes entraîne un rétrécissement de ces voies.

Parallèlement, la destruction du parenchyme pulmonaire permet de relier plusieurs sacs alvéolaires entre eux ce qui génère un élargissement des espaces aériens. Cette altération du parenchyme est également associée à une perte de l'élasticité pulmonaire (Eid *et al.* 2001). Dans les voies aériennes périphériques, l'infiltration par les cellules inflammatoires, la fibrose et l'exsudat inflammatoire sont à l'origine de l'obstruction des voies aériennes (Agusti *et al.* 2003; Barnes 2003). Plusieurs facteurs peuvent expliquer les manifestations cliniques décrites. Premièrement, la forte dégradation de la MEC qui va générer la synthèse de matrikines ayant des propriétés chimio-attractantes vis-à-vis des monocytes et des PN (Sorokin 2010). Certains de ces fragments matriciels, comme le N-acetyl Pro-Gly-Pro, sont des analogues des CXC chimiokines, ce qui leur confère une puissante activité chimio-attractante. Deuxièmement, la présence dans la cigarette de constituants ayant la propriété de ralentir l'élimination des cellules apoptotiques (Vandivier *et al.* 2006) majorant ainsi la synthèse des médiateurs de l'inflammation (Richens *et al.* 2009). Un autre élément important de la chronicité est la composante auto-immune de la BPCO. La production d'auto-anticorps dirigés contre la MEC va produire des matrikines qui vont participer au mécanisme inflammatoire (Lee *et al.* 2007). Enfin, des hypoxies locales ou la diminution de l'expression de certains micro-ARN sont également impliqués dans le processus de chronicité (Pottelberge *et al.* 2011; Wanderer 2011).



Par ailleurs, la BPCO, dans son évolution clinique, est réglée par une succession de phases

stables et de phases d'exacerbation. Les phases d'exacerbation sont caractérisées par une augmentation des symptômes de la BPCO. Dans 80% des cas, les épisodes d'exacerbations sont la conséquence d'une infection bactérienne ou virale. Ces infections, qui n'auraient que peu d'effets chez un individu sain, peuvent être délétères au cours de la BPCO (Seemungal *et al.* 2001; Taylor *et al.* 2009). La fréquence des périodes d'exacerbation augmente avec l'aggravation de la maladie (Donaldson *et al.* 2002).

2.3.2. Genèse de la BPCO

Les mécanismes à l'origine de la BPCO participent d'un processus complexe qui n'est pas encore totalement élucidé. Plusieurs données de la littérature montrent que pour un faible pourcentage de patients (environ 2%) la BPCO peut s'expliquer en partie par un facteur génétique (Sampsonas *et al.* 2006). Ces patients ont une déficience en synthèse d' α 1-antitrypsine ce qui conduit à une activation constante de certaines sérines protéases et en particulier de la NE. Ceci est à l'origine d'une dégradation importante et incontrôlée de la MEC ce qui s'exprime au niveau du poumon par une détérioration intense du parenchyme pulmonaire (Sampsonas *et al.* 2006). Une autre hypothèse suggère que l'origine de la BPCO se trouve dans un déséquilibre de la balance protéases/anti-protéases en faveur des protéases ce qui conduirait à une perte du contrôle de l'inflammation basale existant chez tous les fumeurs (Sampsonas *et al.* 2006). Ceci est soutenu par l'existence d'un modèle murin d'emphysème induit par instillation intra-nasale de NE (Janoff *et al.* 1977). Cependant, chez l'homme, le processus est très probablement plus complexe impliquant de nombreux facteurs incluant d'autres protéases, des cytokines pro-inflammatoires, des radicaux libres,... qui tous sont surexprimés chez les patients BPCO (Roth 2008). Une hypothèse plus récente implique les protéines de la MEC. Le processus inflammatoire initié de façon chronique par la prise quotidienne de tabac conduit à la genèse de protéases capables de dégrader différents composants de la matrice extracellulaire. Plus particulièrement, les protéases à activité élastinolytiques engendreraient une intense dégradation de l'élastine fortement représentée dans le tissu pulmonaire. Les peptides issus de cette dégradation et dont certains d'entre eux ont été décrits dans la littérature pour leurs propriétés biologiques (Abboud *et al.* 2008; Oreilly *et al.* 2008), majoreraient le processus inflammatoire et déborderaient les mécanismes de contrôle de ce processus (*Figure 8*).

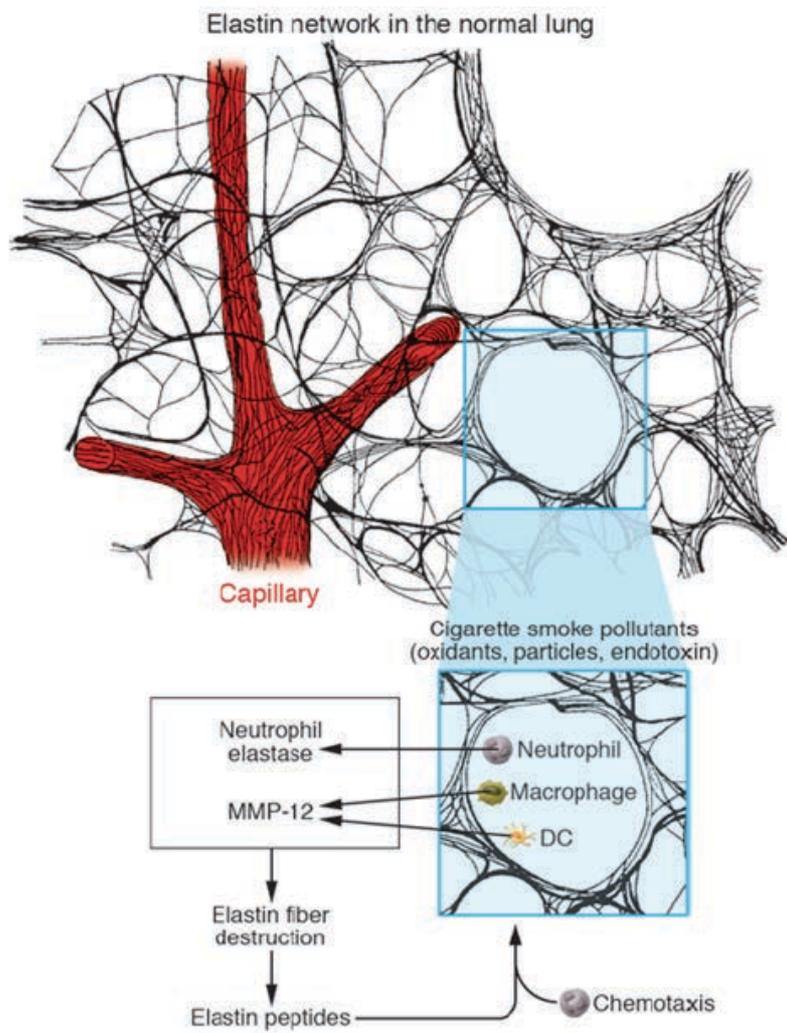


Figure 8 : Peptides d'élastine et implication dans la BPCO
(d'après Taraseviciene-Stewart et al. 2005)

II. Elastine et Peptides d'Elastine

L'élastine est l'une des protéines majoritairement présente au sein de la matrice extracellulaire (MEC) qui apporte élasticité aux tissus soumis à de fortes contraintes mécaniques tels que les poumons, la peau ou les vaisseaux sanguins. Sous l'effet de certaines élastases, l'élastine est dégradée et donne lieu à la libération de peptides de tailles variables. Ces peptides dérivant de l'élastine sont la cause de nombreux processus biologiques d'importance, leur donnant un rôle majeur dans les phénomènes d'inflammation, de vieillissement tissulaire et dans la migration tumorale. Dans ce chapitre, après avoir rappelé les principales caractéristiques de la structure des protéines, nous détaillerons les propriétés biologiques et structurales de l'élastine, des peptides issus de sa dégradation ainsi que les mécanismes d'interaction avec leur récepteur spécifique.

1. La structure des protéines

Il existe quatre grandes classes de biomolécules constituant les êtres vivants. Les acides nucléiques, les glucides, les lipides et les protéines. La première classe représente l'information génétique, caractère transmis lors de la reproduction. Les glucides et les lipides sont à la fois une source d'énergie exploitée par l'organisme mais peuvent également être utilisés comme éléments de structure (ex : bicouche lipidique de la membrane plasmique). Enfin, les protéines, sont impliquées dans la totalité des processus biologiques et possèdent diverses fonctions (enzymes, protéines de structures, messagers...). On peut différencier plusieurs sortes de protéines : les protéines globulaires, membranaires ou fibreuses comme l'élastine.

Une protéine est composée d'une ou plusieurs chaînes d'acides aminés (aussi appelés résidus) liés entre eux par des liaisons peptidiques (chaîne polypeptidique). Les protéines varient grandement les unes des autres par leur taille. En général, on parle de protéine lorsque la chaîne contient au moins 50 acides aminés et de peptide pour des assemblages de plus petite taille. Cet enchaînement possède une organisation tridimensionnelle (ou repliement) qui lui est propre. De la séquence d'acides aminés au repliement, il existe 4 niveaux de

structuration de la protéine. Ces différents niveaux de structuration confèrent à chaque protéine des propriétés et fonctions bien spécifiques.

1.1. Structure primaire

Ce qui distingue les différentes protéines, plus que le nombre d'acides aminés qui les composent, c'est la séquence des acides aminés dans la chaîne polypeptidique, que l'on appelle également structure primaire. Il existe 20 acides aminés (*Figure 9*) qui possèdent tous (excepté la proline) la même base : deux groupes fonctionnels de part et d'autre de leur carbone C_{α} : un groupe carboxyle $-COOH$ et un groupe amine $-NH_2$. Ils ne diffèrent les uns des autres que par leur chaîne latérale (groupement R) portée par le C_{α} . On peut classer les acides aminés en différents groupes, en fonction de la nature de leur chaîne latérale. La chaîne latérale peut être soit hydrophobe, lorsqu'elle ne comporte qu'une chaîne carbonée, soit hydrophile, lorsqu'elle porte des groupements chimiques (chargés ou non) pouvant interagir favorablement avec l'eau. Certains résidus remplissent une fonction particulière, c'est le cas de la cystéine, servant d'intermédiaire à la formation des ponts disulfures.

1.2. Structure secondaire

Le repliement local du squelette polypeptidique donne souvent lieu à l'apparition de certaines régularités appelées éléments de structure secondaire. Ce sont des structures relativement compactes, caractérisées par les angles dièdres ω , ϕ , ψ de leurs résidus (*Figure 10*) et par la présence de certaines liaisons hydrogène.

Les acides aminés sont reliés les uns aux autres par une liaison covalente $O=C - N-H$ appelée liaison peptidique. Cette liaison est plane du fait de sa structure électronique délocalisée. C'est pourquoi l'angle de torsion ω qui caractérise cette liaison peptidique présente généralement une valeur de 180° . Dans ce cas, la liaison est dite trans. Les liaisons trans sont très largement majoritaires dans les protéines et peptides. Seule la proline possède une propension non négligeable à former une liaison cis : dans ce cas, la valeur de l'angle ω est de 0° (Ramachandran *et al.* 1976).

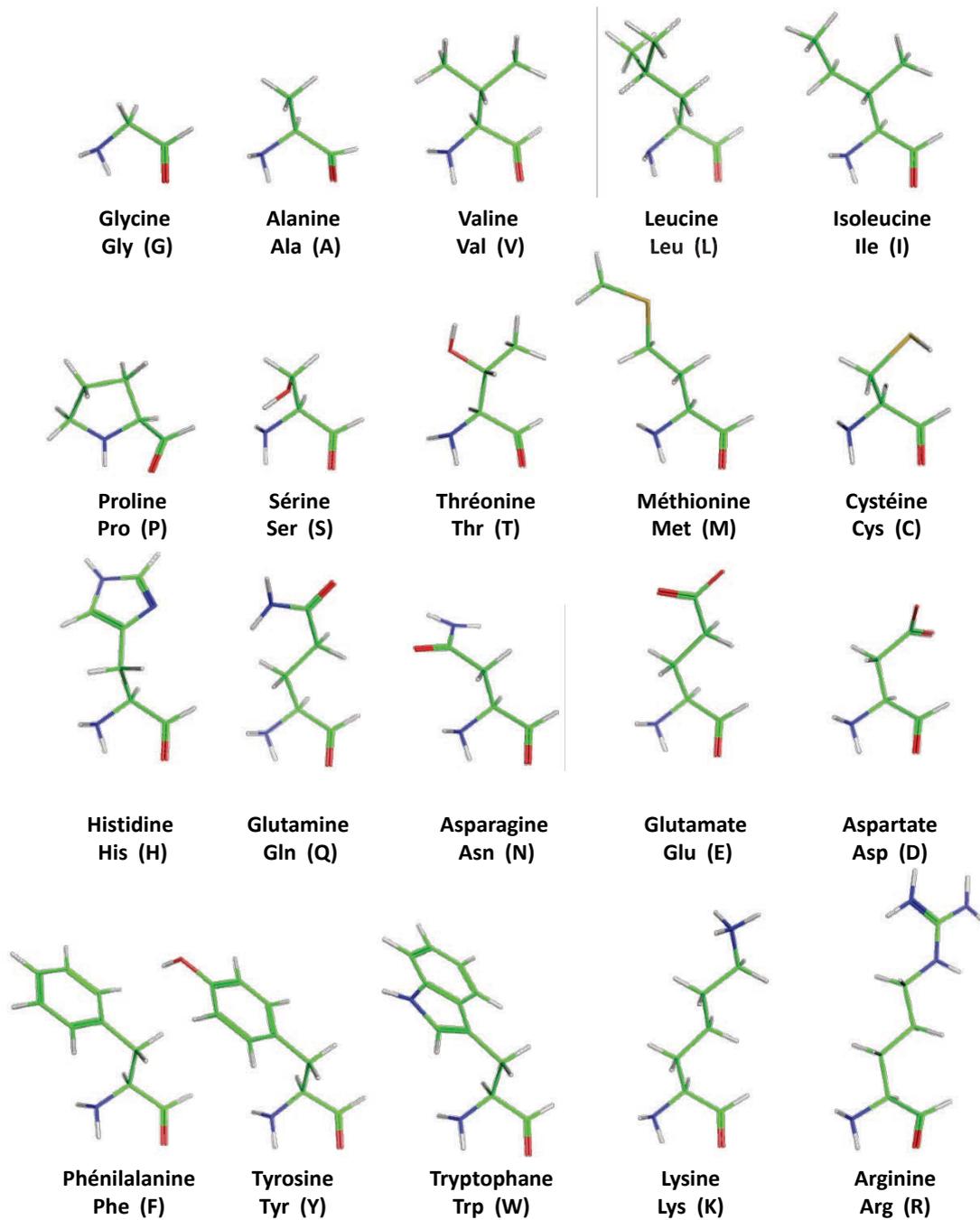


Figure 9 : Structures et codes à 3 et 1 lettre(s) des 20 acides aminés

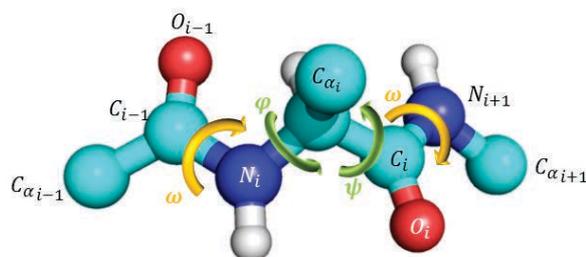


Figure 10 : Représentation des angles dièdres ω , ϕ et ψ

La flexibilité du squelette peptidique dépend donc principalement des angles dièdres φ et ψ qui définissent les rotations autour des liaisons N-C $_{\alpha}$ et C $_{\alpha}$ -C respectivement (*Figure 11*). Ramachandran (Ramachandran et al., 1963) a été le premier à proposer d'utiliser les valeurs de ces deux angles pour tracer une carte 2D, appelée depuis carte de Ramachandran, dans laquelle l'angle φ est reporté en abscisse, l'angle ψ en ordonnée et sur laquelle chacun des résidus est représenté par un point. Cette carte permet donc de voir le comportement des différents acides aminés nous montrant les différentes valeurs d'angles possibles. Cependant, toutes les valeurs d'angles ne sont pas autorisées en raison d'un problème d'encombrement stérique. Ainsi, les résidus des protéines et peptides n'explorent principalement que deux régions de l'espace conformationnel : une première centrée sur ($\varphi = -60^{\circ}$ et $\psi = -30^{\circ}$) et une deuxième sur ($\varphi = -100^{\circ}$ et $\psi = +140^{\circ}$) (*Figure 12a*). A ces deux régions, il faut néanmoins rajouter une région centrée sur ($\varphi = +50^{\circ}$ et $\psi = +30^{\circ}$) pour décrire la majorité des résidus classiques des protéines et peptides. La glycine, dont la chaîne latérale n'est composée que d'un atome d'hydrogène, ne connaît presque pas de restriction de valeurs d'angles dièdres : une très grande partie de la carte de Ramachandran est alors explorée (*Figure 12b*). A l'opposé, la proline, seul acide aminé cyclique, ne possède que deux régions véritablement favorables du point de vue énergétique, situées respectivement en ($\varphi = -60^{\circ}$ et $\psi = -55^{\circ}$) et ($\varphi = -60^{\circ}$ et $\psi = +145^{\circ}$)

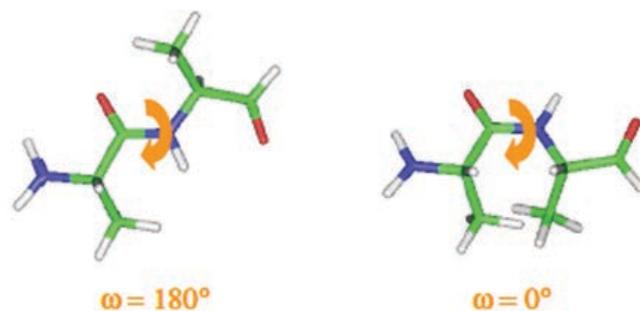


Figure 11 : Représentation de liaisons peptidiques trans ($\omega=180^{\circ}$) et cis ($\omega=0^{\circ}$)

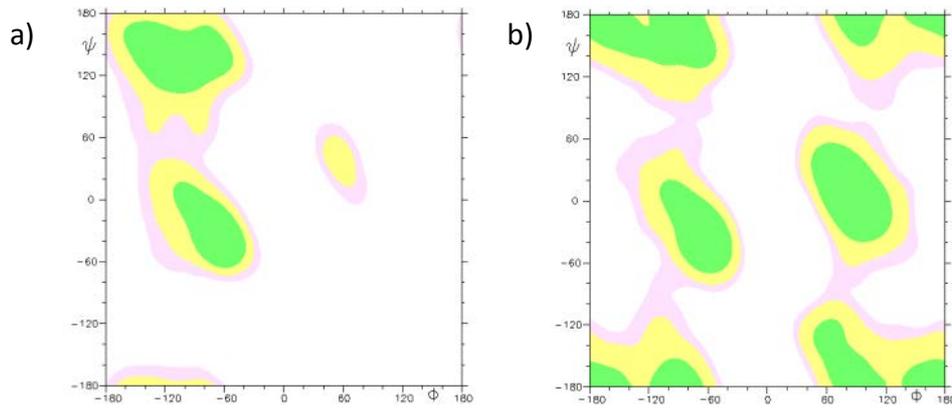


Figure 12 : Cartes de Ramachandran

Ces cartes de Ramachandran classiques montrent les zones de l'espace conformationnel privilégiées a) par tous les résidus excepté Proline et Glycine et b) par la Glycine.

Les structures ordonnées des protéines peuvent être classées en trois catégories : les hélices, les brins et les coudes. Certaines structures n'entrent dans aucune de ces trois catégories, on les considère alors comme des structures secondaires non ordonnées appelée boucles ou pelote statistique (random coil).

1.2.1. Les hélices

La chaîne polypeptidique peut s'enrouler en spirale formant alors une structure en hélice. On retrouve différents types d'hélice en fonction de leur compacité, c'est-à-dire du nombre de résidus par tour d'hélice (*Figure 13*).

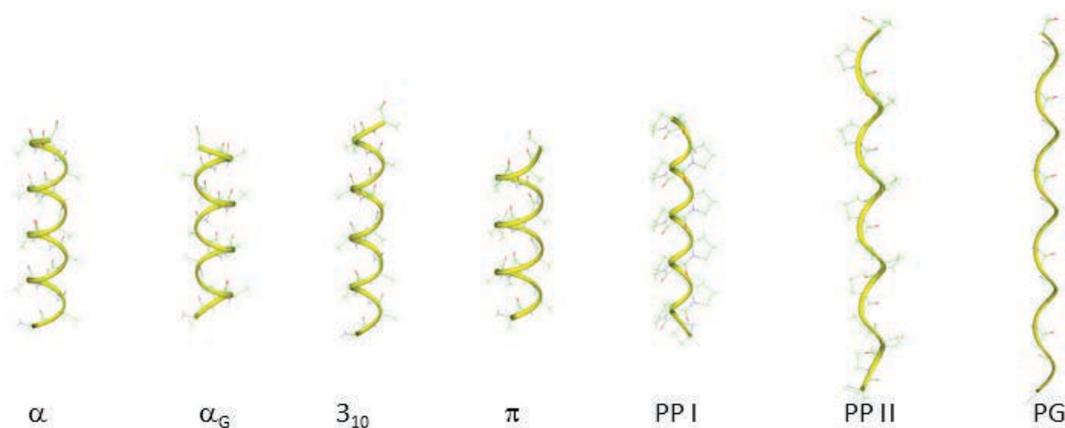


Figure 13 : Différents types d'hélices

L'hélice la plus souvent rencontrée est l'**hélice α** . Cette hélice, constituée de 3,6 résidus par tour, est enroulée vers la droite, les chaînes latérales se projetant alors vers l'extérieur. Elle est caractérisée par des valeurs d'angles dièdre $\varphi = -57^\circ$ et $\psi = -47^\circ$. Cette structure est d'une très grande stabilité en raison de la formation de liaisons hydrogène entre le groupement carboxyle (C=O) résidu i et le groupement amine (N-H) du résidu $i + 4$.

Il existe également la même hélice mais enroulée vers la gauche. On la nomme **hélice α_G** (gauche). Pour cette hélice, les valeurs d'angles dièdres sont tout simplement opposées aux valeurs précédentes avec $\varphi = +57^\circ$ et $\psi = +47^\circ$ et les mêmes liaisons hydrogène la stabilisent. Seuls les résidus glycine peuvent adopter cette structure particulière, expliquant sa rareté.

L'**hélice 3_{10}** est elle aussi moins observée car beaucoup moins stable que l'hélice α . Ne possédant que 3 résidus par tour, elle est donc moins compacte également. Elle est stabilisée par des liaisons hydrogène entre le résidu i et le résidu $i + 3$. Ses angles dièdres sont $\varphi = -49^\circ$ et $\psi = -29^\circ$.

Enfin, l'**hélice π** est le quatrième type d'hélice observé. Cette hélice est la plus compacte avec 4,4 résidus par tour. Comme les précédentes, des liaisons hydrogène stabilisent la structure entre les résidus i et $i + 5$. Ses angles dièdres sont $\varphi = -57^\circ$ et $\psi = -70^\circ$.

D'autres structures hélicoïdales existent. Cependant, leur appartenance à la classe des structures secondaires ne fait pas l'unanimité. Parmi elles, l'hélice de type **polyproline** est constituée le plus souvent d'un enchaînement de résidus proline, bien que d'autres résidus puissent également entrer dans sa constitution. Il existe deux types de structures polyprolines selon la nature des liaisons peptidiques présentes. La structure polyproline ayant une liaison peptidique cis est dite polyproline I (PP I). Cette hélice possède 3,3 résidus par tour et ses angles dièdres sont $\varphi = -83^\circ$ et $\psi = +149^\circ$. La structure polyproline II (PPII) présente elle une liaison peptidique trans. Cette hélice gauche ne possède que 3 résidus par tour et φ et ψ ont des valeurs de -78° et $+149^\circ$ respectivement. Cette structure secondaire PPII a notamment été observée dans les fibres de collagène et d'élastine. Le collagène, par exemple, est composé de l'enroulement de trois chaînes en structure PPII. La présence de ce type de structure a également été démontrée dans l'élastine et certains de ses peptides (Tamburro *et al.* 2003; Boichichio *et al.* 2004).

La structure **polyglycine** est une structure très proche de celle de la polyproline. On la retrouve dans des domaines riches en glycine. Ses angles dièdres sont $\varphi = -80^\circ$ et $\psi = +150^\circ$.

Il faut également savoir que la plupart des hélices ne sont pas droites, un grand nombre d'entre elles peuvent présenter des courbures ou des cassures (Kumar *et al.* 1998).

1.2.2. Les brins et feuillets

La deuxième structure secondaire fréquemment retrouvée dans les protéines est le brin β . Ses valeurs d'angles dièdres $\varphi = +120^\circ$ et $\psi = +120^\circ$ en font une structure étendue. L'association de plusieurs brins β forme un feuillet. Cette structure est stabilisée par des liaisons hydrogène spécifiques. Il existe plusieurs types de feuillets β dont deux plus répandus :

- Le feuillet β parallèle (*Figure 14a*). Les différents brins possèdent la même orientation. Les angles dièdres ont pour valeurs $\varphi = -119^\circ$ et $\psi = +113^\circ$.
- Le feuillet β antiparallèle (*Figure 1b*). Les brins sont orientés de façon inversée. Leurs angles dièdres ont pour valeurs $\varphi = -139^\circ$ et $\psi = +135^\circ$.

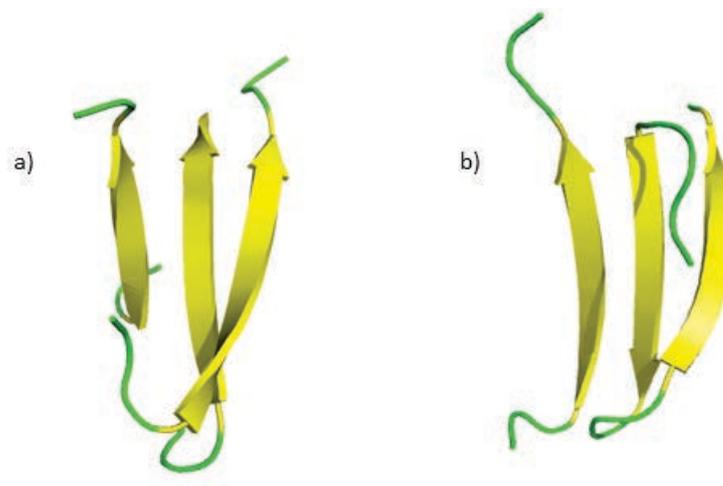


Figure 14 : Feuillets β (a) anti-parallèles et (b) parallèles

1.2.3. Les coudes

Les coudes permettent à la chaîne polypeptidique d'effectuer un changement de direction à 180° . Il existe plusieurs types de coudes, classés selon le nombre de résidus impliqués. On

parle de coudes δ , γ , β , α , et π faisant intervenir 2, 3, 4, 5 ou 6 résidus respectivement (Chou 2000). Les coudes β et γ sont les plus répandus dans la structure des protéines. On les retrouve particulièrement dans les feuillets β antiparallèles où ils relient deux brins β . Les coudes β , formés par quatre résidus consécutifs, sont caractérisés par une distance entre les C_α des résidus terminaux (i et $i + 3$) inférieure à 7\AA . Ils sont le plus souvent stabilisés par une liaison hydrogène entre le C=O et le N-H de ces mêmes résidus (Figure 15). Les coudes β sont classés en sept types réguliers : I, I', II, II', VI (a1 et a2), VIb et VIII (Tableau 4) en fonction de la valeur des angles dièdres φ et ψ de leurs résidus centraux $i + 1$ et $i + 2$. Pour un coude β de type VIII, par exemple, les valeurs de référence sont : $\varphi(i + 1) = -60^\circ$, $\psi(i + 1) = -30^\circ$; $\varphi(i + 2) = -120^\circ$, $\psi(i + 2) = +120^\circ$. Cependant, une certaine tolérance est acceptée quant à la valeur de ces angles. En effet, on accorde une variation de $\pm 30^\circ$ pour trois des angles et de $\pm 45^\circ$ sur le quatrième (Hutchinson and Thornton 1994). Lorsque seul le critère de distance est retrouvé dans un coude β , il est alors classé en coude β de type IV. Il est à noter que les coudes β de type VI ne sont présents que lorsque le résidu en position $i + 2$ possède une liaison peptidique cis, donc essentiellement quand celui-ci est une proline.

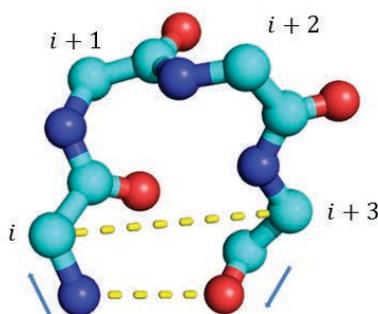


Figure 15 : Représentation d'un coude β

Type de coude	$\varphi(i + 1)$	$\psi(i + 1)$	$\varphi(i + 2)$	$\psi(i + 2)$	$\omega(i + 2)$
I	-60°	-30°	-90°	0°	180°
I'	$+60^\circ$	$+30^\circ$	$+90^\circ$	0°	180°
II	-60°	$+120^\circ$	$+80^\circ$	0°	180°
II'	$+60^\circ$	-120°	-80°	0°	180°
VIII	-60°	-30°	-120°	$+120^\circ$	180°
VIa1	-60°	$+120^\circ$	-90°	0°	0°
VIa2	-120°	$+120^\circ$	-60°	0°	0°
VIb	-135°	$+135^\circ$	-75°	$+160^\circ$	0°
IV	–	–	–	–	

Tableau 4 : Valeurs de référence des angles dièdres des différents types de coudes β

1.2.4. Les boucles

Lorsque la conformation locale d'un segment protéique ne correspond à aucune des structures secondaires précédentes on dit qu'il adopte une conformation en pelote statistique (*random coil*). Ce type de structure est le plus souvent associé aux boucles présentes entre deux éléments structurés tels que les hélices ou les brins. Il faut toutefois bien garder à l'esprit que ce terme ne signifie pas pour autant l'absence de structure stable ou d'une structure particulière. Elles sont la plupart du temps en surface de la protéine et sont constituées d'acides aminés polaires. Les boucles peuvent avoir des fonctions importantes chez un grand nombre de protéines, en ayant par exemple un rôle catalytique ou de reconnaissance moléculaire.

1.3. Structure tertiaire

La structure tertiaire d'une protéine correspond au repliement de la chaîne polypeptidique dans l'espace (ou *fold*) (*Figure 16*). On parle plus couramment de structure tridimensionnelle. Elle peut être vue comme l'assemblage des différents éléments de structures secondaires et va permettre de rapprocher des résidus éloignés dans la séquence pour former des régions fonctionnelles ou des liaisons comme les ponts disulfures.

Un grand nombre d'interactions vont permettre ce repliement ainsi que la stabilisation de la structure tridimensionnelle. En effet, les interactions hydrophobes vont permettre aux acides aminés hydrophobes de s'associer entre eux, généralement dans le cœur des protéines, afin de fuir le contact avec les molécules d'eau du milieu. Ce sont les interactions non liantes, de type électrostatique et de van der Waals, ainsi que les ponts salins, les liaisons hydrogène et les ponts disulfure, qui permettront de stabiliser l'architecture globale.

La structure tridimensionnelle d'une protéine est intimement liée à sa fonction : lorsque cette structure est cassée par l'emploi d'agent dénaturant, la protéine perd sa fonction, elle est dénaturée.

Deux méthodes expérimentales seulement permettent d'accéder à ce niveau de structure : la cristallographie aux rayons X et la spectroscopie RMN. Toutes les structures tridimensionnelles de protéines résolues par ces deux méthodes expérimentales sont stockées dans une base de données accessible sur internet : la Protein Data Bank (www.rcsb.org).

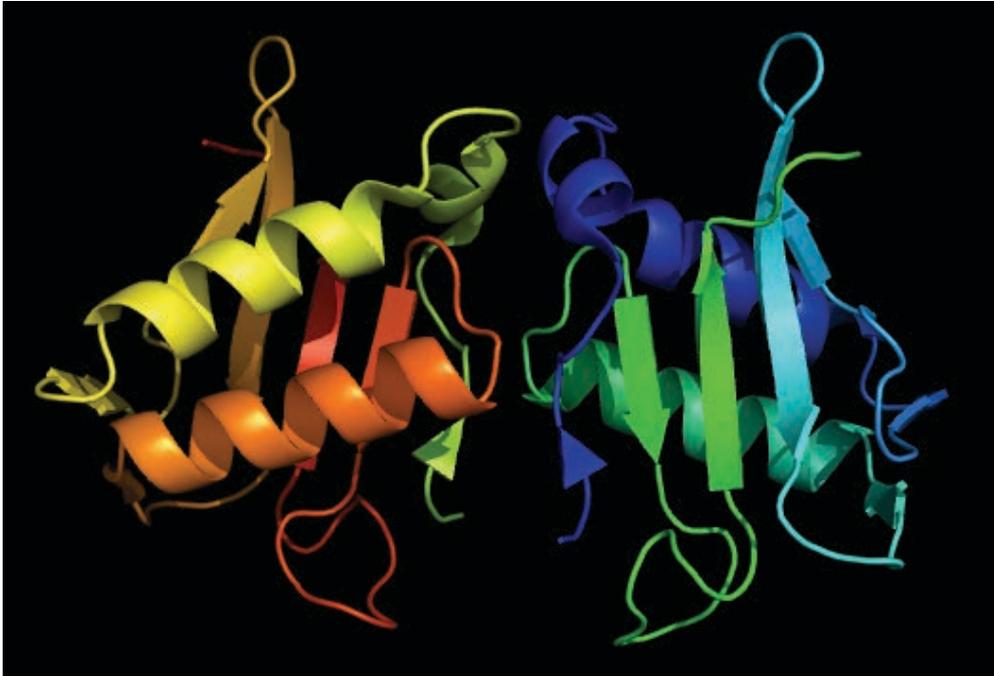


Figure 16 : Structure tertiaire d'une toxine fongique (code pdb 1KPT)

1.4. Structure quaternaire

La structure quaternaire d'une protéine est constituée de l'association de plusieurs sous-unités appelées monomères. On appelle donc une protéine possédant une structure quaternaire, une protéine multimérique. Les monomères peuvent être identiques, comme pour l'hémoglobine qui possède quatre chaînes identiques deux à deux (*Figure 17*), ou différents comme c'est le cas pour le complexe récepteur de l'élastine. Les sous-unités sont stabilisées entre elles par des liaisons faibles (liaisons hydrogène, liaisons ioniques, interactions hydrophobes et de van der Waals), mais rarement par des ponts disulfures, qui ont pour rôle de créer les liaisons inter-chaîne. Toutes les protéines ne présentent pas une structure quaternaire, alors que d'autres nécessitent cette structure pour avoir une activité biologique.

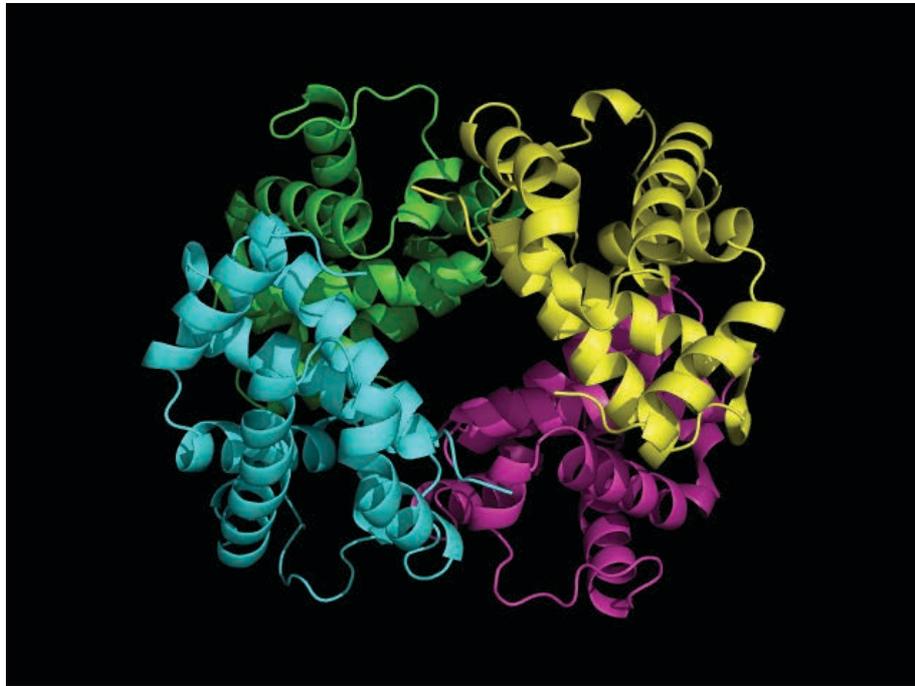


Figure 17 : Structure quaternaire de l'hémoglobine

L'hémoglobine est un exemple de structure quaternaire ; elle est constituée de 4 sous-unités : 2 sous-unités α (de 141 acides aminés) et 2 sous-unités β (de 146 acides aminés).

2. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un composant non-cellulaire présent dans tout l'organisme. Elle est composée de macromolécules extracellulaires telles que des protéoglycannes et des glycoprotéines et de fibres dont les principales sont les fibres de collagène et les fibres élastiques. Au sein de la MEC, les fibres de collagène et d'élastine forment un réseau dense qui assure la résistance aux tensions, alors que les protéoglycannes et les glycoprotéines s'organisent en un réseau plus relâché qui permet de résister aux forces de compression (Culav *et al.* 1999). La composition et l'organisation de la MEC est différente selon les tissus, ce qui oriente considérablement les propriétés mécaniques de ces tissus. Ainsi, la peau, les poumons et les vaisseaux ont des propriétés élastiques en raison de leur richesse en fibres élastiques alors que l'os est rigide et incompressible du fait de sa forte teneur en collagène. La matrice extracellulaire résulte d'un équilibre constant entre la

synthèse et la dégradation de ses composants. La synthèse des composants de la MEC est assurée par les cellules mésenchymateuses (ex : les fibroblastes) qui sont également chargées de leur renouvellement (Rosso *et al.* 2004), alors que la destruction résulte essentiellement de l'activité de protéases (sérines protéases, Métalloprotéinases matricielles,...). La structuration de la MEC résulte donc d'un processus dynamique impliquant de nombreuses activités enzymatiques et non-enzymatiques.

La MEC forme donc un réseau tridimensionnel qui constitue un soutien structural essentiel pour les cellules. Cependant, la MEC n'est pas seulement une assise structurale. Elle est également impliquée dans de nombreux phénomènes comme la morphogénèse, la différenciation tissulaire, la migration, la prolifération ou la survie cellulaire. Elle intervient aussi dans le maintien de l'homéostasie extracellulaire. Elle permet la fixation de facteurs de croissance qui interagissent avec des récepteurs membranaires à la surface des cellules en contact avec la matrice (Frantz *et al.* 2010).

La MEC est majoritairement composée de trois classes de macromolécules : les protéoglycanes, les glycoprotéines comme la fibronectine, et les protéines fibreuses comme le collagène et l'élastine. L'organisation de ces différentes macromolécules confère à la MEC ses propriétés structurales et ses fonctions de régulation de l'activité cellulaire (Bosman *et al.* 2003).

1.3. Les protéoglycanes (PG)

Les PG sont des macromolécules complexes de grande taille. Elles sont composées de longues chaînes polypeptidiques sur lesquelles sont liées de façon covalente des chaînes de glycosaminoglycanes (GAG) formées de résidus osidiques. Les PG occupent la plus grande partie de l'espace extracellulaire sous la forme d'un gel hydraté (Iozzo *et al.* 1996). On les classe selon leur localisation tissulaire, la longueur de leur chaîne polypeptidique et leur composition en GAG. Les variations dans la composition de leur chaîne polypeptidique sont à l'origine de fonctions biologiques très variées (Prydz *et al.* 2000; Yoon *et al.* 2005). Les PG sont extrêmement hydrophiles. Ceci est lié aux groupements acides des chaînes de glycosaminoglycanes qui piègent l'eau. Cette propriété a un rôle prépondérant dans l'hydratation des tissus ainsi que dans la formation d'un gel hydraté résistant à de puissantes forces de compression. Les PG ont également un rôle de structuration en participant à la cohésion et à l'organisation de la MEC. Ainsi, la décorine intervient dans la régulation du

diamètre des fibres de collagène (Keene 2000; Ameye *et al.* 2002; Reed *et al.* 2002). Dans certains tissus les PG s'associent aux fibres de collagène et acquièrent la capacité de lier des facteurs de croissance et des cytokines ce qui crée un stock de ces facteurs pour les cellules avoisinantes (Iozzo *et al.* 1996). Ainsi, ils peuvent agir sur les comportements cellulaires tels que la migration, la prolifération ou la différenciation (Schönherr *et al.* 2000; Villena *et al.* 2004; Schlessinger, Lax *et al.* 1995).

1.4. Les glycoprotéines (GP)

Les glycoprotéines de la MEC sont des protéines liées de façon covalente à un ou plusieurs groupements glucidiques. Elles représentent une catégorie minoritaire par rapport aux autres composants matriciels mais jouent un rôle essentiel. Elles possèdent des chaînes courtes qui peuvent être ramifiées ou cycliques. Les GP possèdent des propriétés et des structures variées. Les GP de la MEC participent aux interactions cellules/matrice et matrice/matrice durant la migration ou l'adhésion cellulaire. Les GP les plus connues sont la fibronectine, les fibrillines, les ténascines, la laminine et les thrombospondines.

1.5. Les collagènes

Les collagènes représentent la famille de protéines la plus abondante de l'organisme humain (25 à 30 % des protéines totales). Dans certains tissus, ces protéines peuvent représenter jusqu'à 80 % des protéines de la MEC. Le collagène est synthétisé par de nombreuses cellules dont les fibroblastes présents ou recrutés dans le milieu interstitiel (De Wever *et al.* 2008). Cette protéine est composée d'un domaine collagénique (COL) et non collagéniques (NC) (Ricard-Blum *et al.* 2005; Gordon *et al.* 2009). Le rôle principal du collagène est d'assurer le maintien de l'intégrité structurale des tissus et des organes chez l'homme. Il procure aux tissus leur résistance aux tensions, il participe à la régulation de l'adhésion cellulaire, et il favorise le chimiotactisme ainsi que la migration tissulaire (Rozario *et al.* 2010).

Les fibres de collagène sont formées d'une association en hélice de trois chaînes polypeptidiques reliées entre elles par des liaisons hydrogène inter-chaînes. Cette structure hélicoïdale particulière est caractéristique des collagènes. Elle est due à la succession de résidus (Gly-X-Y)_n, X et Y étant respectivement la proline (40 % des cas) et la 4-L-

transhydroxyproline (10 % des cas). La prépondérance de ces deux acides aminés confère à la triple hélice une rigidité caractéristique. Ces hélices triple-brins peuvent s'associer entre elles et former des complexes supramoléculaires comme des fibrilles ou des réseaux tridimensionnels selon le type de collagène (*Figure 18*). A ce jour, il a été identifié 28 types de collagène différents chez les vertébrés numérotés de I à XXVIII (Gordon *et al.* 2009).

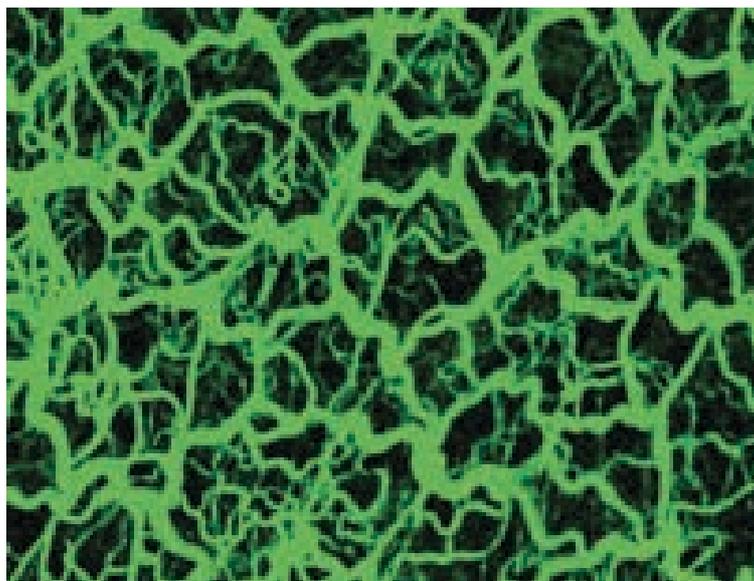


Figure 18 : Répartition des fibres de collagène dans la plèvre viscérale
(d'après Pena *et al.* 2007)

1.6. L'élastine

La deuxième protéine fibreuse, constituant majoritaire de la MEC, est l'élastine. Cette protéine est décrite en détail dans le paragraphe 3.

2. L'élastine : structure génique et synthèse

2.1. Généralités

L'élastine est un composant essentiel de la matrice extra-cellulaire (MEC). Elle est

responsable de l'élasticité des tissus humains et des tissus vertébrés en général. Elle est synthétisée à partir d'un précurseur commun, la tropoélastine (Uitto *et al.* 1991; Mithieux *et al.* 2005). L'apparition de l'élastine au cours de l'évolution coïncide avec la formation d'un système vasculaire clos, ce qui peut être interprété comme une réponse adaptative aux hautes pressions vasculaires. L'élastine est décrite comme un polymère amorphe. Cette protéine hydrophobe est totalement insoluble dans l'eau ainsi que dans de nombreux solvants organiques. Elle est cependant hydratée et son précurseur existe sous forme soluble. L'élastine est le principal constituant des fibres élastiques. L'élastine fait partie des protéines les plus résistantes de l'organisme ce qui lui confère, dans des conditions physiologiques, une demi-vie d'environ 70 ans avec un renouvellement quasi-inexistant. Présente en plus ou moins grande quantité dans l'organisme, l'élastine représente 2 à 3 % de la masse sèche de la peau, 4 % de celle des tendons, 3 à 7 % de celle des poumons. Elle peut représenter jusqu'à 50 % de la masse sèche des ligaments et 30 % de celle des grands vaisseaux sanguins (Vrhovski *et al.* 1998; Wise *et al.* 2009; Mithieux *et al.* 2005). L'élastine est retrouvée dans les tissus soumis à de fortes contraintes mécaniques (*Figure 19*) et sa présence reste indispensable au maintien de l'intégrité et au bon fonctionnement des tissus dans lesquels on la retrouve. L'organisation en fibres de l'élastine permet aux tissus de se déformer et de reprendre leur forme initiale sans dépenser d'énergie (Bedell-Hogan *et al.* 1993). De nombreux tissus comme la peau, les poumons et le cœur dépendent de cette élasticité pour exercer leurs fonctions physiologiques. La dégradation de l'élastine conduit à une perte d'élasticité qui participe au développement de certaines pathologies telle que la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) ou l'Anévrisme Aortique Abdominal (AAA) (Duca *et al.* 2004; Elise E. Schriver *et al.* 1992). La perte d'élasticité est associée à la production de peptides issus de la dégradation de l'élastine et doués d'activités biologiques variées. Ces peptides d'élastine (PE) sont appelés Elastokines (Maquart *et al.* 2004; Wiernicki *et al.* 2008).

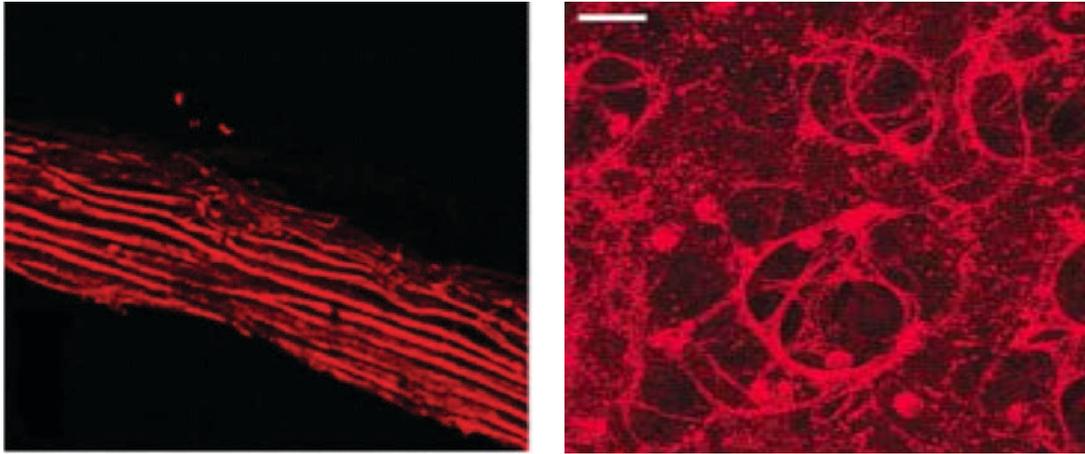


Figure 19 : Organisation des fibres élastiques selon la localisation du tissu considéré
Lames élastiques dans la paroi de l'aorte (gauche), lattices dans les poumons (droite) (d'après Boulesteix *et al.* 2006; Pena *et al.* 2007)

2.2. Structure et régulation du gène de l'élastine

2.2.1. Le gène de l'élastine

Le gène de l'élastine code, chez l'Homme, pour la tropoélastine humaine. Ce gène, présent en un exemplaire unique, est localisé sur la région proximale du bras long du chromosome 7 (locus 7q11.23) (Fazio *et al.* 1991). Il code pour une protéine de 760 résidus et d'environ 70 kiloDaltons (kDa). Le transcrit primaire de 45 kilobases (kb) est composé de 34 petits exons de 27 à 186 paires de bases qui sont insérés entre des introns de tailles plus importantes (Figure 20). Cette particularité donne un ratio exons/introns très faible (Piontkivska *et al.* 2004; Bashir *et al.* 1989). L'ARNm codé par cette séquence a une taille d'environ 3,5 kb et se compose d'un segment de 2,2 kb traduit et d'une région 3' non-traduite de 1,3 kb (Parks and Deak 1990). Le gène de l'élastine donne naissance de nombreuses isoformes du fait d'un fort "épissage alternatif" (Wagenseil *et al.* 2009; Wise *et al.* 2009). Dans la plupart des cas l'épissage supprime l'exon complet mais parfois il peut ne supprimer qu'une partie d'exon aboutissant à la production de nombreuses isoformes de l'élastine pour lesquelles aucune fonctionnalité spécifique n'a été décrite à ce jour. Les exons les plus couramment épissés chez l'homme sont les exons 22, 23, 24, 26A, 32 et 33 (Indik *et al.* 1987). L'exon 22 n'est que très rarement inclus dans le gène transcrit de l'élastine (Wagenseil *et al.* 2009). On dénombre à l'heure actuelle 11 isoformes de la tropoélastine présentes en fonction de différents paramètres : stade de développement, l'origine tissulaire ou encore l'âge (Parks *et al.* 1990).

La structure du gène de la tropoélastine est relativement bien conservée chez les

mammifères. Chez l'homme, les exons 34 et 35 ont été perdus au cours de l'évolution. Ils sont toujours présents dans le génome d'autres espèces comme le lapin, le chat, le porc, le bœuf, le chien ou la souris (Szabó *et al.* 1999). Par ailleurs, chez l'homme la présence de l'exon supplémentaire 26A est spécifique ; il n'est présent dans aucune autre espèce (Indik *et al.* 1987; Bashir *et al.* 1989). Cet exon, très hydrophile, est riche en sérine et en résidus chargés. Il contient la seule histidine de la séquence de la tropoélastine (Indik *et al.* 1987; Bedell-Hogan *et al.* 1993). Cet exon est exprimé uniquement dans quelques états pathologiques comme l'hypertension pulmonaire.

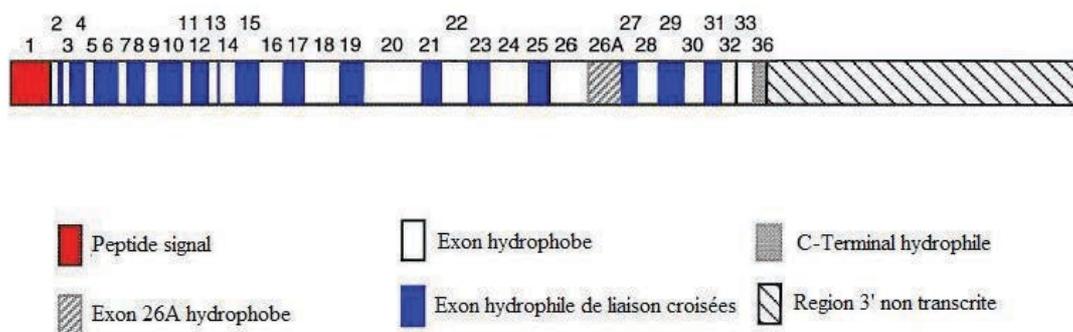


Figure 20 : Structure schématique de l'ADNc de la tropoélastine humaine

(d'après Vrhovski and Weiss 1998).

2.2.2. Régulation du gène de l'élastine

L'expression de la tropoélastine est finement régulée au niveau pré et post-transcriptionnel (Mecham *et al.* 1985). Le promoteur de l'élastine comporte plusieurs domaines permettant la fixation de nombreux facteurs de transcription activateurs ou inhibiteurs. C'est le cas de l'insulin-like growth factor-1 (IGF-1) (Wolfe *et al.* 1993) qui augmente la transcription du gène ou du TNF- α (Kähäri *et al.* 1992) qui inhibe sa transcription en activant la fixation du facteur de transcription Jun/Fos sur le promoteur (Kähäri *et al.* 1992). L'accumulation de l'élastine exerce également un rétrocontrôle négatif sur l'expression du gène (Uitto *et al.* 1991).

2.3. Elastogénèse

2.3.1. La Tropoélastine

L'élastine est obtenue à partir d'un précurseur sécrété, la tropoélastine. La tropoélastine est principalement synthétisée par les cellules musculaires lisses, les fibroblastes et les cellules endothéliales (Rodgers *et al.* 2005; Uitto *et al.* 1991). L'élastine est quasi-exclusivement produite au stade fœtal et durant toute la période entourant la naissance (Uitto *et al.* 1991). Sa demi-vie étant estimée à environ 70 ans, elle n'est que très peu renouvelée en conditions physiologiques. Le gène de la tropoélastine peut être stimulé en cas de lésions, cependant cette néo-synthèse est limitée. En outre, les fibres élastiques nouvellement synthétisées sont peu fonctionnelles car souvent désorganisées (Rucker *et al.* 1984).

La tropoélastine humaine est retrouvée sous la référence P15502 dans la banque de donnée Swissprot (Bairoch and Apweiler 1997). Sa séquence est constituée d'une succession de régions hydrophobes et hydrophiles (*Figure 21*) (Indik *et al.* 1987).

Les régions hydrophobes sont riches en acides aminés apolaires tel que la glycine, la valine, l'alanine, la leucine ou la proline (Wise *et al.* 2009; Vrhovski *et al.* 1998; Mithieux *et al.* 2005), et on y dénombre d'importants motifs répétés. Ce sont les exons 1 (peptide signal), 2, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, et 33. Ils sont responsables des propriétés élastiques de la protéine (Li and Daggett 2002) et c'est à leur niveau que les variations d'épissage sont principalement retrouvées.

Les régions hydrophiles sont principalement constituées de lysines séparées par quelques alanines ou prolines. Ces régions correspondent aux exons 4, 6, 8, 10, 12, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, et 31. Ils sont principalement impliqués dans les domaines de pontages intra- et interchaînes (Bressan *et al.* 1977).

La partie C-terminale est codée par l'exon 36, dans lequel on retrouve les deux seules cystines de la tropoélastine permettant de former un pont disulfure intra-chaîne (Brown *et al.* 1992). Ce domaine basique se retrouve à la surface de la protéine car il est reconnu par des anticorps spécifiques (Wei *et al.* 1998). Cet exon interagit également avec d'autres composants des fibres élastiques lors de l'élastogénèse, dont les MAGP-1 (Microfibril-Associated GlycoProtein-1) (Brown-Augsburger *et al.* 1994; Rucker *et al.* 1984). De plus, ce domaine permet également la fixation de la tropoélastine à une protéine d'importance de la

MEC, l'intégrine $\alpha v\beta 3$ (Rodgers *et al.* 2004).

L'ARNm de la tropoélastine est traduit dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER). Il en résulte une protéine d'environ 72 kDa possédant un peptide signal de 26 acides aminés (exon 1) (Rucker *et al.* 1984) qui sera clivé dans la lumière du RER (Saunders *et al.* 1984). Une fois clivée, la protéine est transportée vers l'appareil de Golgi puis vers la membrane plasmique. Afin d'éviter toute dégradation ainsi qu'une agrégation précoce, la tropoélastine est associée à l'intérieur de la cellule à des protéines chaperonnes dont l'Elastin Binding Protein (EBP).

```

1 : MAGLTAAPR PGVLLLLLSI LHPSPGGVP GAIPGGVPGG VYYPGAGLGA
51 : LGCGALGPGG KPLKPVPGGL AGAGLGAGLG AFPAVTFPGA LVPGGVADAA
101 : AAYKAAKAGA GLGGVPGVGG LCVSAAVVP QPGAGVKPGK VPGVGLPGVY
151 : PGGVLPGARF PGVGVLPVVP TGAGVKPKAP GVGGAFAGIP GVGPPGGPQF
201 : GVPLGYPIKA PKLPGGYGLP YTTGKLPYGY GPGGVAGAAG KAGYPTGTGV
251 : GPQAAAAAAAA KAAAKFGACA AGVLPGVGGA GVPVPGAIP GIGGIAGVGT
301 : PAAAAAAAAA AKAAKYGAAA GLVPGGPGFG PGVVGVPGAG VPGVGPAG
351 : IPVVPGAGIP GAAVPGVSP EAAAAAAAAA AKYGARPGVG VGGIPTYGVG
401 : AGGFPGGVG VGGIPGVAGV PSVGGVPGVG GVPGVGISPE AQAAAAAKAA
451 : KYGAAGAGVL GGLVPGQAA VPGVPTGGV FGVTPAAAAA AKAAAAAQF
501 : GLVPGVGVAP GVGVAPGVV APGVLAPGV GVAPGVVAP GVGVAPGIEP
551 : GGVAAAKSA AKVAAAKQR AAAGLGAGIP GLGVGVPG LGVGAGVPL
601 : GVGAGVPGF AGADEGVRRS LSPELREGDP SSSQHLPSTP SSPRVPGALA
651 : AAKAAKYGAA VPGVLGLGGA LGGVIPGGV VGAGPAAAAA AAKAAKAAQ
701 : SLVGAAGLG GLGVGGLVP GVGGLGIPP AAAKAKYG AAGLGVLGG
751 : AGQFPLGGVA ARPGFGLSPI FPCGACLCKA CCRRRK

peptide signal : MAGLTAAPRPGVLLLLLSILHPSRP

exon 1 : G
exon 2 : GVPGAIPGGVPGVFPY
exon 3 : GAGLGALG
exon 4 : GALGPGKPLKPV
exon 5 : PGGLAGAGLGA
exon 6 : GLGAFPAVTPPGALVPGSVADAAAAYKAAKA
exon 7 : GAGLGGVPGVGGLVSA
exon 8 : GAVPQPGAGVKPGKAP
exon 9 : GVGLPGVPGVLPGCA
exon 10 : RFPGVLVPGVPTGAGVKPKAP
exon 11 : GVGGAFAGIP
exon 12 : GVGPFPGGPQPGVPLGYPIKAPKLE
exon 13 : GGYGLPYTTGKLPY
exon 14 : GYGPGVAGAAKAGYPTGT
exon 15 : GVGPQAAAAAAA KAAAKF
exon 16 : GAGAAGVLPGVGGAGVPGVGAIPGIGIA
exon 17 : GVGPIAAAAAAAAAAKAKY
exon 18 : GAAGLVPGGPGFPGVVGVPGAGVPGVPGAGIPVVPGAGIPGAAVP
exon 19 : GVVSPEAAAAAKAKAAAKY
exon 20 : GARPGVGVGGIPTYGVGAGFPPGFGVGVGGIPGVAGVPSVGGVPGVPGVGIS
exon 21 : PEAQAAAAAKAAAKY
exon 22 : GAAGAGVLGLVPGQAAVPGVPTGGVP
exon 23 : GVGPIAAAAAAAAAAKAKQF
exon 24 : GLVPGVGVAPGVVAPGVGLAPGVVAPGVVAPGVVAPGI
exon 25 : EPGGVAAAAAKSAAKVAAKAQL
exon 26 : RAAGLGAGIPGLGVGVPLGVGAGVPLGVGAGVPGFGA
exon 26A : GADEGVRRSLSPELREGDPSSQHLPSTPSSPRV
exon 27 : PGALAAAKAKY
exon 28 : GAAVPGVLGLGALGGVGIPGVV
exon 29 : SAGPAAAAAAAAAAKAKAAQF
exon 30 : GLVGAAGLGGLGVGGLVPGVGGLG
exon 31 : GIPPAAAKAKAAAKY
exon 32 : GAAGLGVLGAGQFPLG
exon 33 : GVAARPGFGLSPIFP
exon 36 : CGACLGRACCRRRK

```

Figure 21 : Séquence de la tropoélastine humaine.

En bleu les exons « hydrophobes », en rouges les exons « hydrophiles », en rose l'exon 26A, en vert l'exon 36.

L'EBP est également présente dans le complexe récepteur de l'élastine. Elle possède un site de fixation à l'élastine (Saunders *et al.* 1984), ainsi qu'un site galactonectine capable de lier des galactosucres. Le complexe EBP/tropoélastine est sécrété aux abords des fibres élastiques déjà existantes. L'EBP va alors se lier avec des galactosides présents sur des structures annexes, les microfibrilles. Cette liaison entraîne une libération locale de la tropoélastine (Brown-Augsburger *et al.* 1996). Alors que l'EBP est recyclé par les cellules, la tropoélastine interagit avec le réseau de microfibrilles afin d'être correctement alignée (Figure 22).

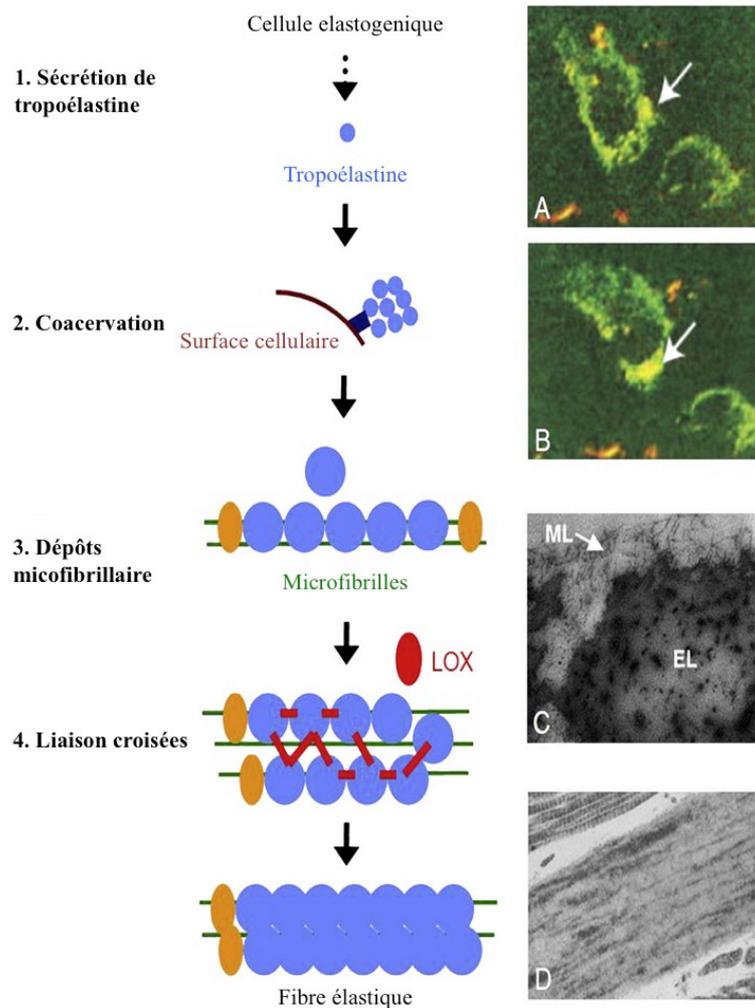


Figure 22 : Modèle classique de l'assemblage des fibres élastiques

(A-B : Sécrétion des molécules de tropoélastine (jaune) par des cellules RLF-6. C : Association de l'élastine (EL) avec des microfibrilles (ML) dans une coupe de peau humaine. D : Micrographie électronique de fibres élastiques dans le derme humain) (d'après Yeo *et al.* 2011)

2.3.2. La formation de liaisons croisées

Sous l'effet de la lysyl oxydase (LOXL), les résidus lysine en position $\text{NH}_2\text{-}\epsilon$ de la tropoélastine subissent une désamination oxydative donnant des allysines. Les allysines et les lysines sont les précurseurs réactifs à l'origine de la formation des liaisons croisées. Ces deux précurseurs interagissent entre eux et forment par simple condensation deux intermédiaires : la lysinonorleucine et l'allysine aldol. Ces deux intermédiaires peuvent à leur tour se condenser afin de former la desmosine. L'allysine aldol peut également se condenser à une autre lysine pour former la merodesmosine qui, à son tour, se condense avec une allysine pour

former l'isodesmosine (Vrhovski *et al.* 1998). Les produits finaux de ces liaisons croisées, la desmosine et l'isodesmosine, résultent donc de la condensation de quatre lysines situées à proximité les unes des autres permettant ainsi de relier deux fibres d'élastine entre elles (Partridge *et al.* 1964; Foster *et al.* 1974) (*Figure 23*). Les desmosines et isodesmosines, qui sont deux structures typiques de l'élastine, sont des marqueurs de la dégradation de l'élastine (Gottlieb *et al.* 1996).

Ces modifications post-traductionnelles sont essentielles pour l'intégrité structurale et fonctionnelle de la fibre mature (Umeda *et al.* 2001; Clarke *et al.* 2006; Kagan *et al.* 1995; Debelle *et al.* 1999). Elles génèrent des liaisons croisées intra et interchaînes entre les molécules de tropoélastine. Il en résulte une polymérisation irréversible des monomères de tropoélastine rendant l'élastine insoluble (Debelle *et al.* 1999).

2.3.3. Les microfibrilles

Les microfibrilles sont des protéines associées à l'élastine. Elles sont formées par les fibrillines 1 et 2 qui sont des protéines acides comportant de nombreuses cystéines et possédant de nombreux sites de fixation au calcium (Kielty *et al.* 2002; Kielty *et al.* 2002). Elles représentent environ 5 à 10 % des fibres élastiques (Ross *et al.* 1969). Les microfibrilles associées à l'élastine se comportent comme une ossature permettant le dépôt, l'orientation et enfin l'assemblage de la tropoélastine monomérique (*Figure 24*). Les microfibrilles sont les premiers composants à se former dans la MEC. Elles apparaissent avant l'élastine durant le développement embryonnaire. Six à huit monomères s'associent en réseau pour former la structure de base de la microfibrille avant de fixer d'autres protéines telle que les Glycoprotéines Associées aux Microfibrilles (MAGP) qui vont stabiliser la structure en créant des ponts disulfures et des points d'ancrage pour la fixation ultérieure de l'élastine (Gibson *et al.* 1996; Henderson *et al.* 1996).

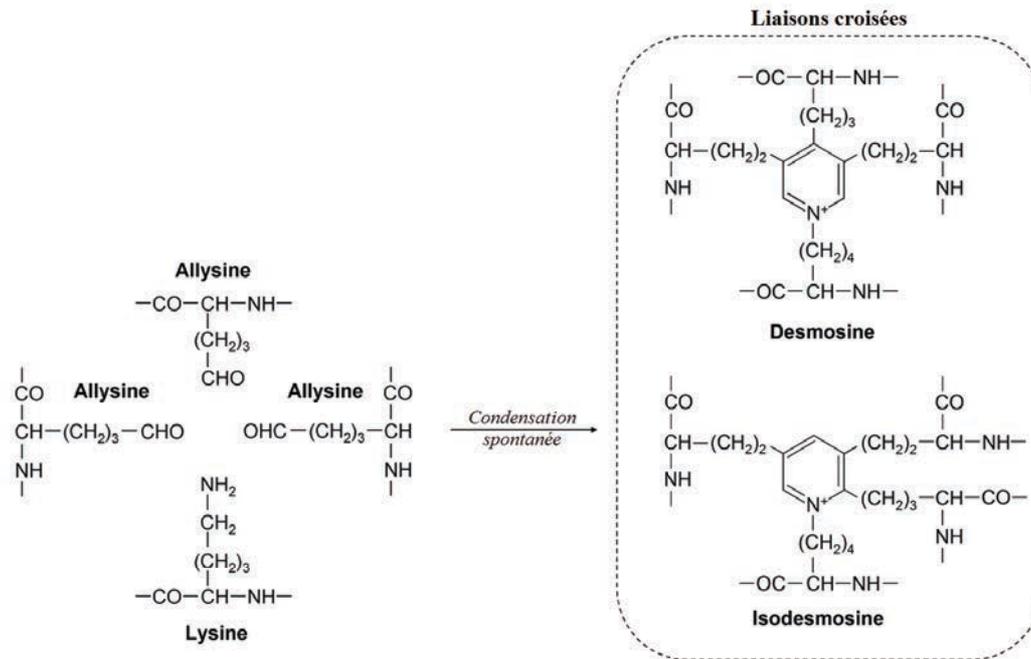


Figure 23 : Modèle de formation des liaisons croisées de l'élastine
(d'après Oitate *et al.* 2006).

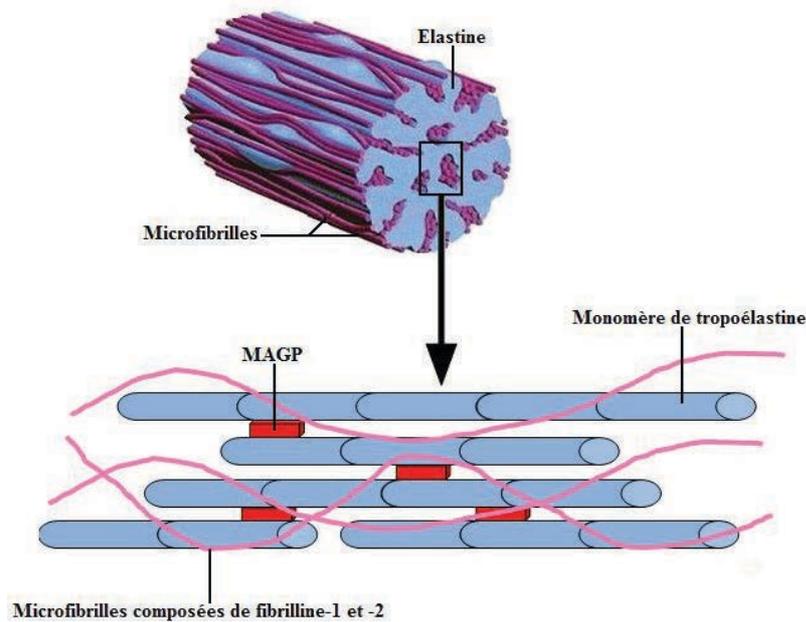


Figure 24 : Représentation schématique d'une fibre élastique
(Adapté d'après <http://www.unifr.ch/anatomy/elearningfree/>)

3.3.4. L'élastine mature

Alors que les monomères de tropoélastine sont des molécules solubles, l'élastine mature est un polymère totalement insoluble. Les monomères sont liés les uns aux autres de façon covalente par des liaisons croisées. Ces dernières peuvent être bi-, tri-, ou tétra-fonctionnelles (Vrhovski *et al.* 1998). Les premiers pontages qui se mettent en place sont ceux impliquant les séquences codées par les exons 10, 19 et 25 de l'élastine humaine (Brown-Augsburger *et al.* 1996). Ils permettent d'augmenter considérablement l'hydrophobie et la stabilité de la molécule d'élastine. Entre ces domaines se trouvent des régions très hydrophobes qui malgré leur hydrophobie se trouvent très hydratées. Ce sont ces domaines qui sont à l'origine de l'élasticité de la molécule. Leurs conformations sont transitoires et extrêmement mobiles. En effet, l'eau permet d'augmenter l'entropie de la molécule d'élastine, et c'est cette variation d'entropie qui provoque la tension ou la relaxation de la fibre. A l'état relaxé, on observe une forte hydratation de l'élastine donc une entropie élevée. A l'inverse, à l'état étendu, l'hydratation et l'entropie diminuent. L'élasticité résulte donc d'une balance entre ces deux états (Debelle *et al.* 1999).

Du fait de sa structure particulière et de ses propriétés physicochimiques, l'élastine ne peut pas être cristallisée. Les méthodes expérimentales classiques ne permettent donc pas de déterminer sa structure tridimensionnelle.

Une estimation du pourcentage de structure secondaire de la tropoélastine a été réalisée, suggérant une structure secondaire globale constituée d'environ 10 % d'hélices α , 35 % de brins β et 55 % de structures non régulières (Alix 1997; Debelle *et al.* 1999). Ces estimations ont également été confortées par d'autres études (Vrhovski *et al.* 1997; Muiznieks *et al.* 2003).

A l'heure actuelle, quatre modèles tentent de décrire l'architecture générale du réseau d'élastine (*Figure 25*) :

Le Modèle du réseau aléatoire : La fibre d'élastine serait constituée d'un réseau de chaînes pontées de manière aléatoire et se déplaçant librement. Lorsque la fibre est étirée, les chaînes sont alors ordonnées ce qui limite la liberté conformationnelle et diminue l'entropie.

Le Modèle de la goutte liquide : La fibre d'élastine serait composée de l'association de monomères globulaires liés par des liaisons croisées et dont les domaines hydrophobes sont masqués au centre du polymère. L'étirement de la fibre diminue l'entropie mais expose

également ces domaines hydrophobes au solvant et ainsi la force hydrophobe participe également à l'élasticité de la fibre.

Le Modèle "Oiled coil" : Dérivé du modèle de la goutte liquide, les monomères sont fibrillaires et s'associent en alternant les liaisons croisées α -hélicoïdales et de larges rouleaux "oiled coil" qui sont les domaines hydrophobes de la protéine masqués au repos. L'hydrophobie participe donc également à l'élasticité de la fibre.

Le Modèle fibrillaire : La fibre élastique serait composée de spirales β conformationnellement libres et espacées par des tours β qui confèrent l'élasticité.

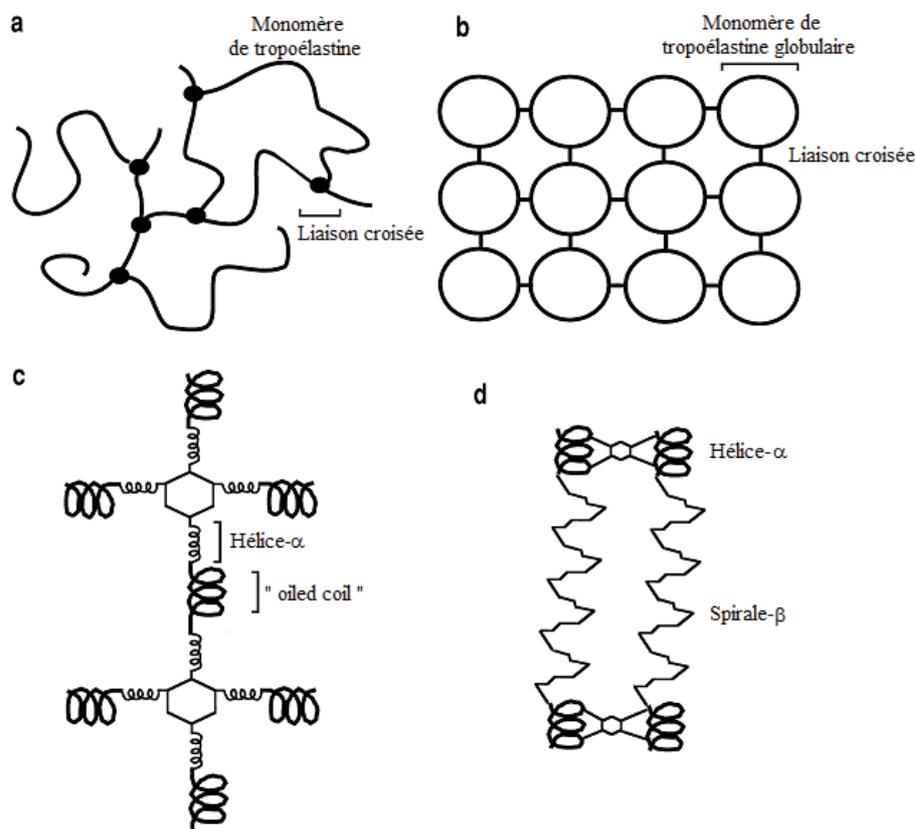


Figure 25 : Modèles structuraux de l'élastine

- a) Modèle du « réseau aléatoire » : chaînes aléatoires maintenues par des liaisons croisées, b) Modèle de la « goutte liquide » : molécules de tropoélastine globulaire liées par des liaisons croisées, c) Modèle « oiled-coil » : alternance de domaines en hélice α liant deux chaînes ou plus et une structure « oiled-coil » formée par les domaines hydrophobes, d) Modèle « fibrillaire » : régions en hélice α liées à une spirale β formée par les domaines hydrophobes répétés (d'après Vrhovski and Weiss 1998).

4. Les Peptides d'élastine

4.1. Généralités

L'existence de petits peptides provenant de la dégradation de la MEC a été démontrée dès les années 1960. Plusieurs protéases avaient alors été décrites (Elastase du Neutrophile, MétalloProtéaseMatricielle (MMP),....) comme capables d'hydrolyser les constituants de la MEC et de libérer des peptides dont certains d'entre eux interagissaient avec des récepteurs présents à la surface des cellules. Le terme "Matrikine", quant à lui, fut introduit pour la première fois en 1999 par l'équipe de FX Maquart (Maquart *et al.* 1999; Duca *et al.* 2004). Ce terme désigne des peptides issus de la dégradation partielle des protéines de la MEC et doués d'activités biologiques. Les matrikines, interagissant avec des récepteurs spécifiques, vont déclencher différentes cascades de signalisation intracellulaire qui sont impliquées dans de nombreux processus tels que la cicatrisation, la progression tumorale, l'adhésion cellulaire, la migration, la prolifération, ou encore l'apoptose (Maquart *et al.* 2004; Duca *et al.* 2004).

Les matrikines sont issus de différents constituants de la MEC (élastine, collagène, laminine...). Elles exercent leurs effets biologiques par le biais de récepteurs spécifiques. Certaines matrikines partagent le même récepteur. C'est le cas en particulier du Complexe Récepteur de l'Elastine (CRE) qui peut lier les peptides d'élastine ou la laminine (Kielty *et al.* 2002).

4.2. Genèse des peptides d'élastine

L'élastine est une macromolécule très résistante qui possède une demi-vie estimée à 70 ans et qui lui permet de couvrir presque entièrement la vie d'un homme (Petersen *et al.* 2002). Durant cette période, elle n'est pas ou que très peu renouvelée. Les grandes capacités de résistance physique, chimique et mécanique de l'élastine en font une macromolécule très peu dégradée en condition physiologique. Seule la grossesse, la croissance, la réparation tissulaire et le vieillissement sont le siège d'une certaine dégradation de l'élastine (Werb *et al.* 1982). En revanche, l'élastine peut être facilement dégradée dans certaines conditions pathologiques telles que les pathologies vasculaires (anévrisme, artériosclérose...) (Fülöp *et al.* 1990) ou lors d'un processus inflammatoire touchant des tissus riches en élastine (poumon, peau, artère,...) (Taggart *et al.* 2005). Quel que soit le contexte physiopathologique, la dégradation de l'élastine par des protéases va conduire à la production de peptides d'élastine (PE). Parmi

les protéases à activité élastinolytique on peut citer *i*) les sérines protéases telles que l'élastase du neutrophile (NE) ou la Cathepsine G (Stone *et al.* 1982), *ii*) différentes MMPs telles que les MMP-2 et 9 (gélatinases A et B), la MMP-7 (matrilysine), ou la MMP-12 (élastase du macrophage) (Shapiro 1994), et *iii*) la protéinase 3 (Antonicelli *et al.* 2007). Des PE peuvent également être obtenus *in vitro* par hydrolyse chimique de l'élastine insoluble. Ainsi, l'hydrolyse par l'acide oxalique permet d'obtenir de l' α -élastine (Partridge *et al.* 1955) et celle par la potasse éthanolique de la κ -élastine (κ E) (Jacob *et al.* 1987). Cependant, ces hydrolyses chimiques génèrent des mélanges de peptides d'élastine de masses moléculaires variables et non contrôlées. La κ E constitue toutefois un bon modèle reproduisant des effets biologiques identiques à ceux obtenus par l'action des protéases élastinolytiques (Brassart *et al.* 2001).

La plupart des peptides d'élastine obtenus après action de protéases élastinolytiques exercent des effets biologiques via la séquence consensus GXXPG, séquence minimale (Brassart 2000). Chez l'homme, l'exon 24 du gène de l'élastine code pour la répétition six fois de l'hexapeptide Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly (VGVAPG), séquence minimale d'interaction avec le récepteur de l'élastine.

4.3. Propriétés biologiques des peptides d'élastine

Les peptides d'élastine possèdent de nombreuses fonctions biologiques qui diffèrent selon le type cellulaire et/ou la séquence du peptide (*Tableau 5*). De façon focalisée, nous présentons ci-après le rôle joué par les peptides d'élastine dans la régulation de la réponse inflammatoire et immunitaire. Le rôle des peptides d'élastine au cours de la BPCO est également abordé.

4.3.1. Peptides d'élastine et polarisation de la réponse lymphocytaire T

Les cytokines produites par les lymphocytes T jouent un rôle central dans l'inflammation et dans la réponse immune. Ainsi, la balance Th-1/Th-2, qui régule l'équilibre des cytokines pro- et anti-inflammatoires, est importante dans la protection de l'hôte contre les infections. Au cours de l'athérosclérose, la réponse immunitaire est caractérisée par un profil cytokinique de type Th-1 avec production d'IL-2, d'IFN- γ , d'IL-12, d'IL-15 et d'IL-18 (Frostegård *et al.* 1999) alors que dans l'anévrisme aortique abdominal (AAA) la balance semble pencher vers

un profil cytokinique de type Th-2 avec une production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-10. Par ailleurs, le récepteur de l'élastine a été mis en évidence à la surface des lymphocytes T isolés de plaques d'athérome (Péterszegi *et al.* 1996) et les PE sont fortement présents dans le sérum de patients atteints d'athérosclérose. Nous avons montré dans notre laboratoire, en collaboration avec l'unité CNRS du Pr FX Maquart, que le récepteur S-gal est présent à la surface des lymphocytes T humains circulants et que l'interaction des peptides d'élastine avec ce récepteur oriente les lymphocytes T naïfs vers un phénotype de type Th-1 et inverse la polarisation de lymphocytes pré-orientés Th-2 également vers un profil Th-1 (Debret 2005). Rapporté aux pathologies artérielles, nos travaux montrent que les effets polarisateurs des PE vis-à-vis des lymphocytes T pourraient amplifier la réponse Th-1 initiée lors de lésions athérosclérotiques et donc aggraver la pathologie artérielle, ou, au contraire, pourraient réguler la réponse Th-2 initiée lors du développement de l'AAA et donc exercer un effet bénéfique sur la pathologie.

4.3.2. Peptides d'élastine et régulation de la réponse inflammatoire

Au cours des pathologies inflammatoires, les cellules inflammatoires se retrouvent dans un milieu complexe constitué de nombreux facteurs solubles pouvant provenir à la fois d'un environnement exogène (agents microbiens) et d'un environnement endogène (peptide issu de la dégradation de la MEC). Dans un tel contexte, nous avons montré que les PE exercent des activités inhibitrices sur les effets induits par le LPS (composant de la paroi des bactéries à Gram négatif) au niveau des monocytes humains. Ainsi, les PE diminuent le niveau de production des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IL-6) induit par une activation des monocytes humains par le LPS. Cet effet est la conséquence de l'interaction des PE avec le récepteur S-gal exprimé à la surface des monocytes. Cet effet inhibiteur n'est pas limité à une activation par le LPS puisque que nous avons retrouvé cet effet dans un modèle de mélanome où un état d'inflammation est associé à un processus tumoral. Dans ce modèle, il a été mis en évidence au laboratoire le potentiel inhibiteur des PE sur la synthèse de deux cytokines pro-inflammatoires, l'IL-8 et GRO- α , induite par l'IL-1 β dans les mélanocytes (Baranek *et al.* 2007).

4.3.3. Peptides d'élastine et BPCO

Les cellules inflammatoires infiltrées dans le parenchyme pulmonaire sécrètent de nombreuses protéases impliquées dans les lésions tissulaires (Owen 2005; Shifren 2006). Certaines de ces protéases (NE, MMP-12) participent à la dégradation de l'élastine qui assure l'élasticité du poumon (Owen 2005; Lombard *et al.* 2006). La forte excrétion de desmosine, marqueur spécifique de la dégradation de l'élastine (Gottlieb *et al.* 1996), et les taux élevés de peptides d'élastine dans différents liquides biologiques (sang, LBA, expectorations) sont le reflet d'une dégradation intense de l'élastine pulmonaire chez les patients atteints de BPCO (Betsuyaku *et al.* 1996; E E Schriver *et al.* 1992). Au cours de l'emphysème humain, les fortes concentrations de PE dans les LBA corrélaient avec le niveau élevé d'élastase du PN dans les mêmes fluides et avec la sévérité de la pathologie (Betsuyaku *et al.* 1996). Ces PE exercent un fort pouvoir chimio-attractant vis-à-vis des monocytes et des polynucléaires neutrophiles isolés de patients emphysémateux ou provenant d'un modèle expérimental d'emphysème murin (Hance *et al.* 2002; Houghton 2006; Hunninghake *et al.* 1981) (Figure 26). Par ailleurs, des anticorps circulants anti-élastine ont été retrouvés au cours de l'emphysème humain et dans le modèle murin emphysémateux (Lee *et al.* 2007; Brandsma *et al.* 2010). Le taux de ces anticorps corréla avec la sévérité de la maladie. Les PE ont également été décrits comme impliqués dans la régulation de la réponse Th/Th-17 au cours de la BPCO (Kheradmand *et al.* 2012). Enfin, nous avons récemment montré dans notre laboratoire que les propriétés migratoires des PN de patients BPCO ainsi que leur capacité à synthétiser des cytokines pro-inflammatoires et à produire des dérivés actifs de l'oxygène sont réduites en présence de PE. Ceci est directement lié au niveau d'expression du récepteur de l'élastine à la surface des PN de patients BPCO qui est lui-même dépendant de la concentration de PE circulants dans l'environnement immédiat des PN. Ainsi, nous avons mis en évidence que la forte sécrétion en PE au cours des phases d'exacerbation dérégule fortement le niveau d'expression du récepteur de l'élastine à la surface des PN ce qui les rend moins susceptibles aux effets des PE (Dupont *et al.* 2013).

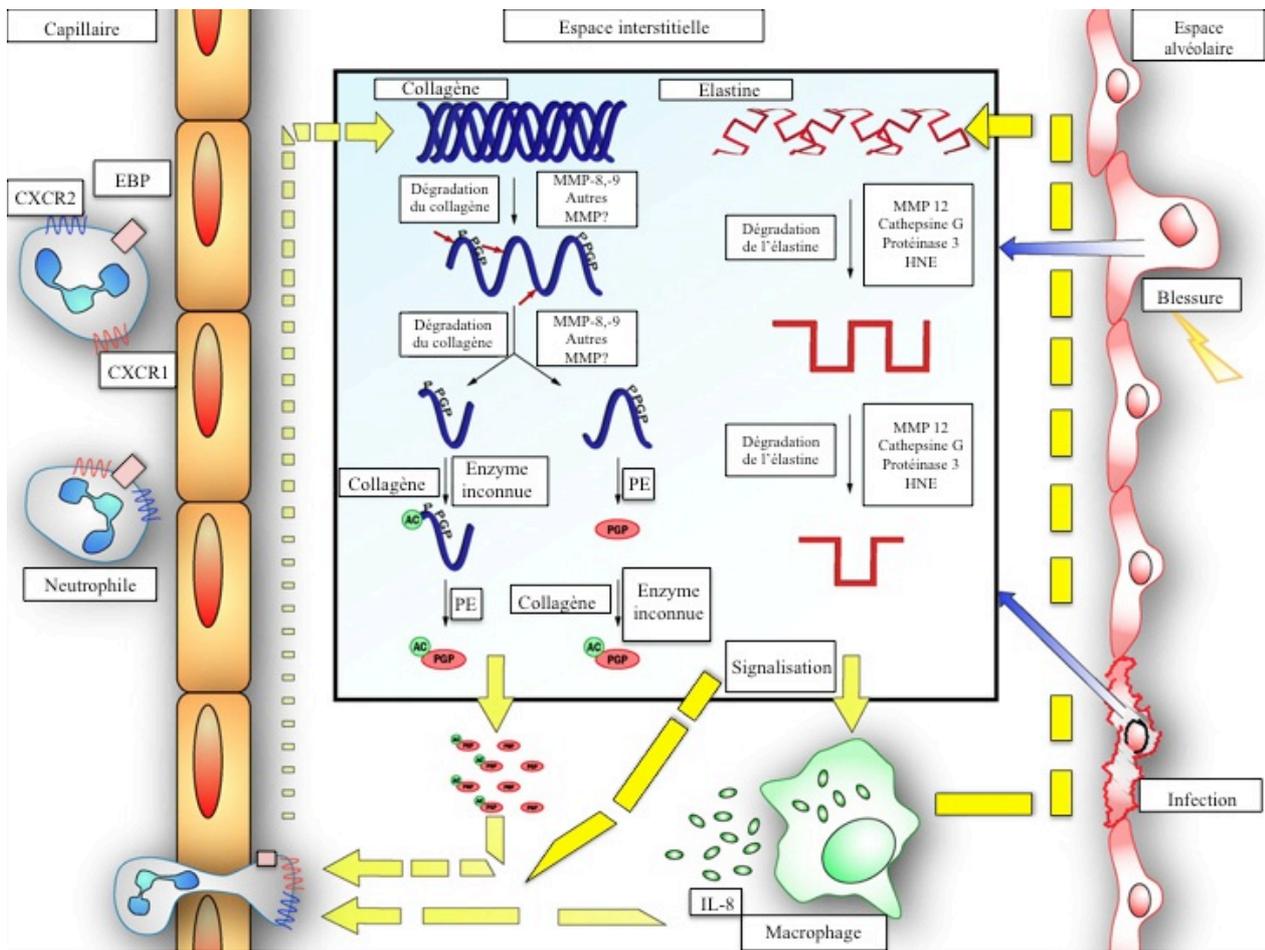


Figure 26 : Effet chemo-attractant des PE vis-à-vis des neutrophiles au cours de la BPCO
(d'après Djekic, Gaggarr, and Weathington 2009)

Matrikines	Type cellulaire	Effet biologique
VGVPAG	PNN	<ul style="list-style-type: none"> - Augmentation du $[Ca^{2+}]_i$ - Production de SOD - Production d'élastases

	Fibroblastes de la peau	Prolifération
	Fibroblastes, monocytes, PNN	Chimiotactisme
PGVGVA, VGVGVA	PMN	Voir VGVAPG
VGVP	Monocytes	Chimiotactisme
VG, PG, P, PV, V	Huvec	- Vasodilatation - Augmentation du Ca^{2+}_i
k-élastin	Fibroblastes de la peau, monocytes, cellules musculaires lisses	- Flux ioniques
PGAIPG, VGAMP, VGMAP, VGSPLP, VGLSPG, AGAIPG, PAVP	PNN, cellules de carcinomes pulmonaires, fibroblastes	Chimiotactisme
GAIP	Cellules tumorales M27	
YGV, FGV	Monocytes	Chimiotactisme
GVAP	Monocytes	Chimiotactisme
GLVP	Fibroblastes bovins	Chimiotactisme
VGAP		Chimiotactisme
AGVPFGV GFGVAGV GFGV, GGVAP	Fibroblastes bovins	Chimiotactisme
GLGVAGV	Cellules endothéliales bovines	Chimiotactisme
LGTP	Chondroblastes bovins, Cellules de mélanome A2058	Chimiotactisme

Tableau 5 : Exemples des effets biologiques induits par les peptides d'élastine

(d'après Rodgers and Weiss 2005)

4.4. Propriétés structurales des peptides d'élastine : approche in silico

Les effets biologiques engendrés par les peptides d'élastine suite à leur interaction avec le récepteur sont nombreux et apparaissent chez de nombreux types cellulaires différents (Senior *et al.* 1984, Duca *et al.* 2004). Le récepteur de l'élastine est en particulier capable de reconnaître indifféremment la tropoélastine, les peptides VGVAPG, PGAIPG ou LGTIPG ainsi que d'autres peptides présentant une séquence similaire, tous reconnus par un même anticorps (Senior *et al.* 1984; Grosso *et al.* 1993b; Grosso *et al.* 1993a), ce qui laisse supposer un motif structural commun d'interaction. Pourtant, les premières études structurales réalisées par spectroscopies de résonance magnétique nucléaire (RMN) ou dichroïsme circulaire (CD) sur certains peptides (dont GLVPG, VGVAPG, GVAPG et GGVP) n'avaient pas réussi à mettre en évidence de conformation spécifique (Castiglione Morelli *et al.* 1997), probablement du fait de la grande flexibilité de ces peptides.

Plus récemment, des études ont démontré que ces mêmes peptides étaient capables d'induire une production de MMP-1 et MMP-3 par les fibroblastes humains. En revanche, cette production n'était pas observée lorsque les cellules étaient stimulées par des peptides ne contenant pas la séquence consensus GXXPG ou si la Glycine terminale n'était pas présente (Brassart 2000; Fuchs, Debelle, and Alix 2001).

Afin de déterminer plus précisément la nature conformationnelle de ces peptides, des méthodes de prédictions des coudes β , couplée à une banque de 205 protéines de structures connues, ont été développées, permettant de proposer une structure en coude β de type VIII sur le motif GXXP (Fuchs *et al.* 2001; Fuchs *et al.* 2005). De nombreuses simulations de dynamique moléculaire ou de Monte Carlo ont depuis confirmé ces prédictions. Il a, en particulier, été démontré que la présence d'un résidu X avant le motif GXXP favorisait la conformation d'un coude β de type VIII. A l'inverse un résidu X après le motif ne semble pas être nécessaire au repliement en coude β de type VIII (Moroy *et al.* 2005), bien que la présence d'une glycine après le motif GXXP semble toutefois nécessaire à l'activité biologique du peptide (Brassart 2000).

Les résultats des simulations de dynamique moléculaire réalisées sur 128 peptides issus de la séquence de la tropoélastine et possédant la séquence GX_1X_2P (Moroy *et al.* 2005) montrent que deux résidus particuliers, lorsqu'ils se trouvent en position centrale X_1 ou X_2 , semblent également avoir une importance prépondérante sur le repliement en coude β du motif GXXP : la proline et la glycine. En effet, la glycine de par sa grande flexibilité (elle explore la quasi-totalité de la carte de Ramachandran) augmente l'entropie du peptide, lui

permettant plus difficilement d'accéder durablement à une conformation en coude β de type VIII. Le taux de coudes β de type VIII est alors nettement diminué. Par ailleurs, la glycine, contrairement aux autres résidus, lorsqu'elle est en position X_1 , permet la présence, très transitoire, d'autres types de coudes, comme le coude β de type II'. C'est le cas par exemple du peptide GGVP, dont l'inactivité vis-à-vis de la chemoattraction de monocytes a été démontrée (Castiglione Morelli et al. 1997) et pour lequel les simulations de dynamiques moléculaire ont montré sa faible propension à se replier en coude β de type VIII sur GGVP mais la présence transitoire de coudes β de type II' (Moroy *et al.* 2005). En revanche, la présence d'une proline en position centrale X_1 aura l'effet inverse. En effet, les valeurs des angles dièdres de cet acide aminé étant très restreintes, elles favoriseront une région de la carte de Ramachandran proche de celle que doit prendre le 1^{er} résidu central pour que le motif GXXP soit en coude β de type VIII. C'est probablement la nature cyclique et très contrainte de la proline, qui, diminuant son entropie, lui confère un rôle stabilisant pour ce type de conformation. En revanche, lorsqu'une proline est située en position X_2 , plus aucun coude n'est alors observé (Moroy 2005).

Le peptide le plus étudié possédant la séquence consensus GXXPG est le peptide VGVAPG. Ce peptide est retrouvé à six reprises dans la séquence de la tropoélastine humaine (Bashir *et al.* 1989). L'analyse de ce peptide, par les différentes méthodes théoriques (dynamique moléculaire, Monte-Carlo, carte adiabatique), a montré que VGVAPG se repliait lui aussi très favorablement en coude β de type VIII sur ses résidus centraux GVAP (Floquet *et al.* 2004). Cette conformation en coude β de type VIII permet de placer les groupements amides des deux résidus centraux dans la même direction, leur permettant certainement d'interagir avec l'EBP en formant des liaisons hydrogènes augmentant la stabilité du complexe peptide-récepteur (*Figure 27*). Cette orientation spécifique n'est pas retrouvée dans les autres types de coudes.

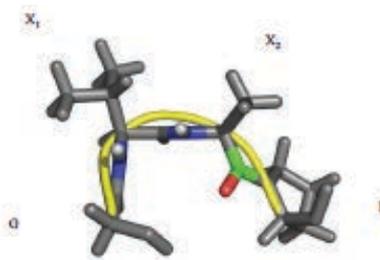


Figure 27 : Représentation d'un coude β de type VIII sur le motif GXXP.

5. Le Récepteur de l'élastine

5.1. Le complexe récepteur de l'élastine

Le complexe récepteur de l'élastine (CRE) a été mis en évidence pour la première fois dans les années 1980 par l'équipe de RM Senior à la surface des monocytes puis par la suite à la surface de nombreux types cellulaires (Senior *et al.* 1980; Senior *et al.* 1984; Hinek *et al.* 1988). Le CRE est dérivé du complexe lysosomal de la β -galactosidase. Il se compose de trois sous-unités distinctes : l'Elastin Binding Protein (EBP) qui est une protéine périphérique de 67 kDa liant l'élastine, et la Protective Protein Cathepsin A (PPCA) et la Neuraminidase-1 (Neu-1) qui sont deux protéines transmembranaires respectivement de 55 et 61 kDa (Duca *et al.* 2007; Mecham *et al.* 1989) (Figure 28).

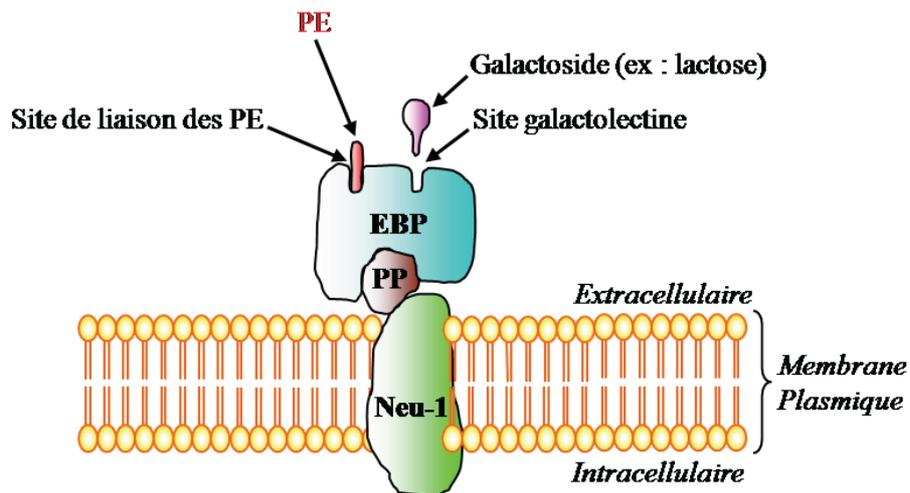


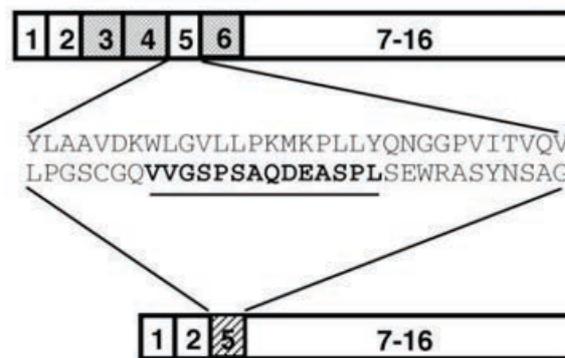
Figure 28 : Représentation schématique du complexe récepteur de l'élastine

5.1.1. L'EBP

L'EBP est une protéine de 67 kDa localisée à la membrane des cellules. C'est un variant d'épissage inactif de la β -galactosidase, protéine lysosomale ubiquitaire, également appelée S-gal (Spliced-Galactosidase) (Hinek et al. 1993). Cette variation d'épissage entraîne une première délétion des exons 3 et 4 ce qui entraîne un décalage du cadre de lecture de l'exon suivant. La transcription de l'exon 5 va donc engendrer une séquence unique de 32 résidus dont 14 résidus correspondent à un site de fixation à l'élastine : VVGSPSAQDEASPL. La seconde délétion se produit sur l'exon 6 permettant de restaurer le cadre de lecture initiale (Figure 29).

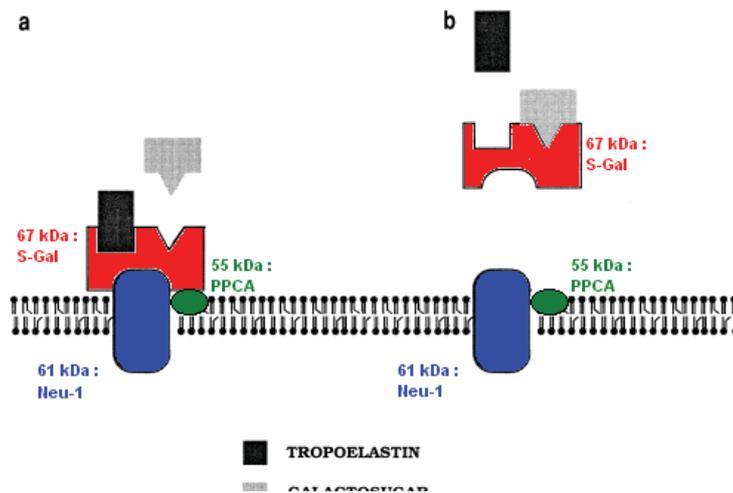
L'EBP possède un site de liaison à l'élastine qui reconnaît principalement le peptide VGVAPG. L'EBP possède également un site de liaison aux galactosides (site galactonectine) comme le lactose. La fixation d'un sucre sur le site galactonectine a pour conséquence une modification structurale de l'EBP conduisant à une diminution de l'affinité pour l'élastine puis à une dissociation de l'EBP du reste du CRE (Figure 30). Ainsi, le lactose est couramment utilisé comme inhibiteur non compétitif des peptides d'élastine (Hinek *et al.* 1988). L'EBP possède un troisième site de fixation à la PPCA qui permet de le relier au reste du complexe. En plus de son rôle de récepteur, l'EBP joue également un rôle de protéine chaperonne lors de la sécrétion de la tropoélastine dans le milieu extracellulaire. Elle empêche l'agrégation et la dégradation précoce de l'élastine (Hinek *et al.* 1988).

ARNm codant pour le précurseur de l'enzyme β -Galactosidase



ARNm codant pour le variant épissé (S-gal)

Figure 29 :
schématique des
primaires de la
l'EBP.



**Représentation
transcrits
 β -gal et de**

Figure 30 : Effets des galactosucres sur le récepteur de l'élastine
(d'après Vrhovski and Weiss 1998)

5.1.2. La PPCA

La PPCA est une protéine membranaire synthétisée sous forme de zymogène qui une fois dans le lysosome est clivée en deux sous-unités de 32 et 20 kDa reliées les unes aux autres par des ponts disulfures interchaînes (Hiraiwa 1999). L'activité sérine protéase qu'elle présente dans le lysosome n'est pas nécessaire au fonctionnement du CRE. Son rôle exact n'est pas encore connu, mais il semble que la PPCA serve de protéine protectrice des deux autres sous-unités du CRE en évitant leur dégradation (Callahan 1999).

5.1.3. La Neuraminidase-1

La neuraminidase-1 (Neu-1) est une sialidase. Elle clive les résidus d'acides sialiques liés à des glycoprotéines ou à des glycolipides. Il existe quatre types de neuraminidases (Neu-1 à Neu-4) dont Neu-1 qui est lysosomale (Monti et al. 2010). Cette enzyme est présente dans la majorité des types cellulaires des vertébrés (Monti *et al.* 2010). Neu-1 est tout d'abord synthétisée sous la forme d'une pré-proenzyme de 45,5 kDa. Après plusieurs glycosylations la protéine mature peut atteindre un poids moléculaire allant de 48,3 à 61 kDa. Son association à la PPCA est nécessaire à son activité. Elle joue un rôle important dans la signalisation cellulaire et notamment dans la transduction du signal induit par la fixation des peptides d'élastine à l'EBP (Duca *et al.* 2007).

5.2. Les voies de signalisation dépendantes de l'EBP

L'interaction de l'élastine ou de ses produits de dégradation avec l'EBP mobilise de nombreuses voies de signalisation. Les voies de signalisation mises en jeu dépendent à la fois des effets biologiques et du type cellulaire impliqué (Duca *et al.* 2004). La cascade d'activation mettant en jeu les facteurs FAK, c-src, PDGF, Raf, Ras, MEK1/2, et ERK1/2 est impliquée dans la prolifération cellulaire (Jacob *et al.* 1987; Faury *et al.* 1998; Varga *et al.* 1989). Dans les fibroblastes, la libération de protéases sous l'effet des PE est la conséquence de la mise en jeu successive de la PI3K, Raf-1, MEK1/2 et ERK1/2 ce qui active le facteur de transcription AP-1 (Duca *et al.* 2002). Dans certaines lignées de cellules tumorales, les effets chimio-attractants des PE sont la conséquence de l'activation de la PLC et de la PKC (Blood and Zetter 1989), alors que dans les monocytes, les mêmes effets sont liés à une augmentation de la GMPc (Fülöp *et al.* 1986). Dans les PN, le complexe récepteur de l'élastine est couplé à une protéine G sensible à la toxine pertussique (PTX). La stimulation des PN par les PE induit la formation d'IP₃ (Varga *et al.* 1989) ce qui amène une augmentation significative de la concentration en calcium intracellulaire. Plus récemment, nous avons montré dans le laboratoire que les PE activent les voies de signalisation Erk1/2 et P38 et mettent en jeu les facteurs de transcription AP-1 et NF-κB dans les LT humains, les cellules de mélanome et dans le monocyte (Debret *et al.* 2005 ; Debret *et al.* 2006; Baranek *et al.* 2007). La complexité des voies de signalisation mise en jeu lors de l'interaction PE/récepteur de l'élastine est résumée sur la *Figure 31*.

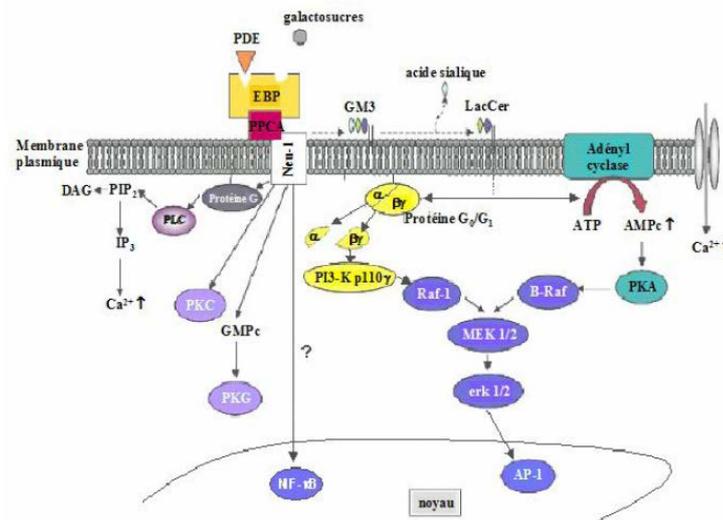


Figure 31 : Synthèse des voies de signalisation mises en jeu lors de l'interaction PE/Complexe Récepteur de l'Elastine
(d'après Debret 2005)

5.3. Les autres récepteurs

Le CRE n'est pas le seul récepteur des peptides d'élastine (Hahn *et al.* 1997). Ainsi, la Galectine-3 est également considérée comme un récepteur potentiel de l'élastine (Ochieng 1999). Elle est présente à la surface de nombreuses cellules en situation normale et pathologique (tumorale) exerce diverses fonctions biologiques. Elle est impliquée dans de nombreux processus cellulaires comme l'adhérence, la différenciation (Argüeso *et al.* 2011), l'angiogenèse, la migration (Saravanan *et al.* 2009), la production de cytokines, et le chimiotactisme (Rabinovich *et al.* 2002). L'interaction de la Galectine-3 avec l'élastine et les peptides d'élastine est lactose-dépendante (Ochieng 1999). L'intégrine qui possède une forte affinité pour la partie C-terminale de la tropoélastine humaine (Rodgers *et al.* 2005) est également considéré comme un récepteur possible de l'élastine. L'intégrine $\alpha\beta3$ est impliquée dans l'élastogénèse et dans l'adhésion cellulaire (Rodgers *et al.* 2004).

5.4. Modèles structuraux du récepteur de l'élastine : approche *in silico*

La structure exacte du récepteur de l'élastine reste encore inconnue. Mais puisque l'EBP est le variant inactif d'épissage de la β -galactose, qui est elle-même associée dans la membrane des lysosomes à une neuraminidase (Neu-1) de 61 kDa et à une protéine protectrice (PPCA) de 55 kDa, il a été proposé que l'architecture moléculaire des deux complexes était similaire (Hinek 1996). Il a d'ailleurs été démontré que l'association entre la β -galactosidase, la Neu-1 et la PPCA est nécessaire au niveau de la membrane lysosomale pour la stabilité et l'activité de la β -galactosidase (Galjart *et al.* 1988; D'Agrosa *et al.* 1988; Potier *et al.* 1990). Aucune structure tridimensionnelle n'est encore connue que ce soit pour la β -galactosidase mais également pour la neuraminidase humaines.

5.4.1. L'Elastase Pancréatique Porcine (PPE)

Il a été démontré qu'un même anticorps reconnaissait de manière spécifique la séquence de l'EBP permettant la fixation de l'élastine, et celle de l'élastase pancréatique porcine (PPE) (Hinek and Rabinovitch 1994). Cette séquence consensus, formée de 14 résidus et nommée peptide S-gal (Spliced galactosidase) dans l'EBP, possède une forte homologie de séquence (40% d'identité) avec la partie N-terminale de la PPE et est retrouvée également chez d'autres protéines ou d'autres espèces (*Figure 32*). Elle possède en outre la propriété de se lier seule à l'élastine, via les répétitions VGVAPG de l'exon 24 du gène de l'élastine confirmant qu'il

s'agit bien du même site de fixation à l'élastine que l'EBP.

EBP humaine (peptide S-gal)	VVGSP	SAQDE	ASPL
EBP ovine	VVGGT	EAQRN	SWPL
Elastase pancréatique porcine (PPE)	VVGGT	EAQRN	SWPS
Elastase leucocytaire humaine	IVGGR	RARPH	AWPF
Facteur IX humain	VVGGE	DAKPG	QFPW

Figure 32 : Homologies de séquence du peptide S-gal

Il a été proposé en 2009 un modèle d'interaction entre différents peptides contenant la séquence GXXPG et la structure cristallographique de l'Elastase Pancréatique Porcine, utilisée alors comme modèle pour le récepteur (Moroy *et al.* 2009). Des calculs de docking moléculaire réalisés avec AutoDock (Morris *et al.* 1998) entre la PPE et différents peptides dont VGVAPG, ont montré que les peptides d'élastine possédaient bien une grande affinité pour les 14 premiers résidus de la PPE qui correspondent au peptide S-gal. Les peptides se lient tous dans une conformation similaire caractérisée par un coude β de type VIII légèrement déformé sur le motif GXXP. Ce coude entoure un résidu particulier de la PPE, le résidu Gln-8, qui est également présent dans la structure de l'EBP (Figure 33). Le complexe ainsi formé est de plus stabilisé par différentes liaisons hydrogène, plus particulièrement entre les résidus Gln-8 et Glu-6 de l'EBP et les résidus centraux (X_1 et X_2) du motif GXXPG.

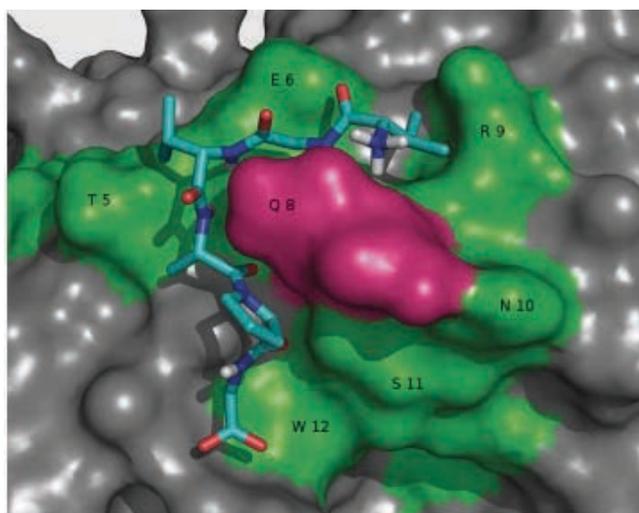


Figure 33 : Modèle d'interaction entre PE et PPE
(d'après Moroy *et al.* 2009)

5.4.2. Modèle par homologie de l'EPB

Récemment, un autre modèle d'interaction entre VGVAPG et une structure tridimensionnelle de l'EBP obtenue par modélisation par homologie, a été proposé (Blanchevove et al. 2012). Dans cette étude, le modèle par homologie a été réalisé à l'aide du logiciel MODELLER (Sali A *et al.* 1993 ; Eswar *et al.* 2006) en utilisant la structure cristallographique de la β -Galactosidase de *Penicillium sp* comme protéine patron (code pdb 1TG7). Cette protéine possède une homologie de séquence de 50% (30 % d'identité) avec l'EBP. La modélisation par homologie n'a toutefois été effectuée que sur la partie commune à l'EBP et à la β -Galactosidase de *Penicillium sp*. Cette partie exclut le peptide V32 (s'étendant de la Leu-83 à la Gly-114), nom donné au peptide de 32 résidus qui contient le site de fixation à l'élastine, donc la séquence S-gal. Cette portion de la structure a été modélisée *de novo*, c'est-à-dire en l'absence de toute structure de référence connue.

Dans ce modèle de l'EBP (*Figure 34*), la séquence V32 incluant le site de fixation, se trouve à la surface de la protéine et délimite une poche en forme de fer à cheval. Des simulations de docking, réalisées avec le logiciel AutoDock, proposent un modèle d'interaction dans lequel VGVAPG adopte également une structure proche d'un coude β de type VIII, légèrement ouvert. En revanche, le peptide ne semble pas interagir avec le même résidu Gln que dans notre précédent modèle, mais davantage avec le résidu Leu-103 (équivalent à Ser-14 dans la PPE). Trois résidus sont alors présentés comme particulièrement importants pour l'interaction : Glu-137, Leu-103 (équivalent à Ser-14 dans la PPE et appartenant à S-gal) et Arg-107 appartenant à la séquence V32.

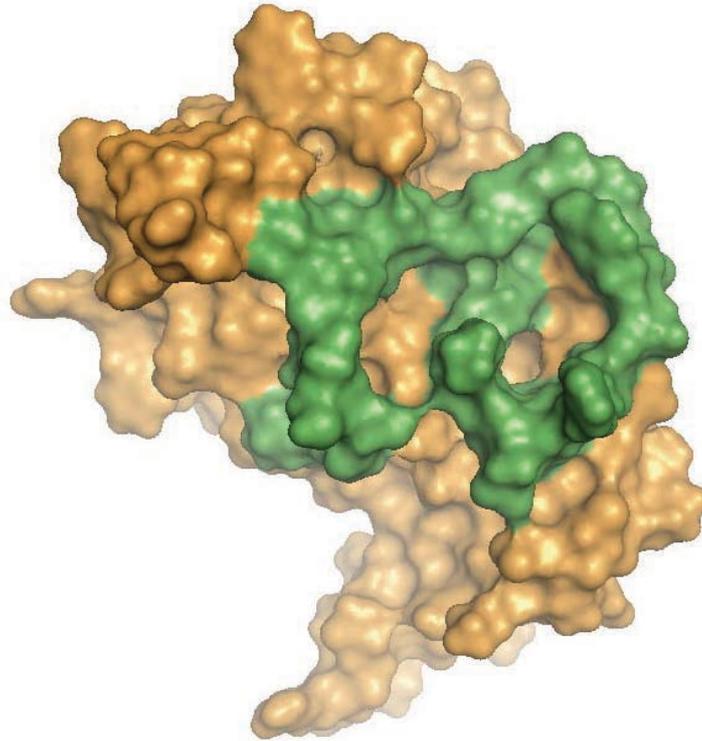


Figure 34 : Modèle tridimensionnel de l'EBP obtenu par modélisation par homologie.
Dans cette représentation, la séquence V32 est représentée en vert et le reste de la protéine en orange
(Blanchevoye *et al.* 2012).

PARTIE 2 : But du travail

Les fibres élastiques assurent l'élasticité de nombreux tissus et en particulier du tissu pulmonaire. L'élastine qui est le composant majoritaire des fibres élastiques peut être le siège, au cours de certains processus physiopathologiques, d'une profonde élastolyse générant des peptides solubles d'élastine. Ces peptides exercent leurs activités biologiques via leur interaction avec un récepteur spécifique. Plusieurs études ont mis en évidence la présence du récepteur de l'élastine à la surface de nombreux types cellulaires et en particulier à la surface des cellules impliquées dans la réponse inflammatoire et immunitaire. A partir de travaux réalisés dans notre Unité, nous avons montré que la présence du récepteur de l'élastine à la surface des monocytes humains et des polynucléaires neutrophiles confère aux peptides d'élastine un rôle clé dans la régulation des cytokines inflammatoires et donc dans la régulation du processus inflammatoire et de la réponse immune. Au cours de la BPCO, la réponse inflammatoire est caractérisée par une infiltration massive du tissu pulmonaire par les polynucléaires neutrophiles qui sécrètent de nombreuses protéases. Ces protéases participent à la dégradation de l'élastine et à la genèse de peptides solubles d'élastine, retrouvés dans les principaux fluides des patients BPCO, dont les taux élevés ont été corrélés avec la sévérité de la maladie comme cela a été montré dans un modèle murin de la maladie emphysémateuse. Les peptides d'élastine, par le biais de leurs propriétés chimiotactiques, participent à l'infiltration des polynucléaires neutrophiles dans le parenchyme pulmonaire des souris et ainsi au déclenchement d'un processus inflammatoire.

C'est dans ce contexte scientifique que nous avons émis l'hypothèse que les peptides d'élastine jouaient un rôle important au cours de la BPCO et que l'exposition de souris au peptide d'élastine de référence VGVAPG pouvait seule initier une inflammation chronique et une détérioration du parenchyme pulmonaire. Après avoir démontré la capacité du peptide VGVAPG à induire chez la souris un processus inflammatoire de type emphysémateux, nous avons recherché par des études de modélisation moléculaire à identifier des peptides susceptibles d'antagoniser, *in vitro* et *in vivo*, les effets du peptide VGVAPG.

PARTIE 3 : Matériels et Méthodes

L'appellation de modélisation moléculaire regroupe les diverses méthodes permettant de prédire le comportement d'un ensemble de molécules en évaluant leurs énergies. La modélisation moléculaire permet de décrire le comportement électronique des atomes et petites molécules pour expliquer leur réactivité, de comprendre les processus de repliement d'une protéine ou encore d'expliquer les processus mis en jeu au niveau atomique lors d'une interaction protéine-ligand.

La taille du système moléculaire peut varier, allant de petites molécules diatomiques jusqu'à des macromolécules biologiques de plusieurs dizaines de milliers d'atomes comme des peptides ou de plus grosses protéines retrouvés *in vivo*. Ce type d'expérimentation était d'abord limité aux petites molécules en raison de la forte puissance de calcul nécessaire. Cependant, les progrès technologiques réalisés dans le domaine de l'informatique ces dernières années, ont permis de diminuer significativement les temps de calculs et donc d'analyser des complexes moléculaires de tailles toujours plus grandes et sur des durées toujours plus importantes.

La description des interactions au niveau atomique doit se faire a priori dans le cadre de la mécanique quantique, en résolvant directement l'équation de Schrödinger, incluant explicitement tous les électrons et noyaux du système. Cependant, la masse des électrons étant très inférieure à celle des noyaux, on effectue une première approximation, selon laquelle tous les électrons s'adaptent instantanément aux mouvements des noyaux (approximation de Born-Oppenheimer). En pratique, ces calculs sont extrêmement longs et limités à des systèmes de petites tailles (quelques dizaines d'atomes lourds). Ainsi, lorsque l'on souhaite simuler des systèmes comportant des centaines ou des milliers d'atomes (comme c'est le cas lorsque l'on étudie des macromolécules biologiques), il est nécessaire d'aborder le problème dans le cadre de la mécanique classique. Dans l'approche classique, on utilise également l'approximation de Born-Oppenheimer mais sans décrire la structure électronique. Les interactions entre atomes sont alors régies par une fonction d'énergie potentielle dont les variables sont les coordonnées nucléaires et dont la forme est donnée *a priori*. Les termes de celle-ci représentent les interactions entre atomes, inter- et intramoléculaires. Ils dépendent de paramètres qui sont ajustés de manière à reproduire les propriétés énergétiques de systèmes moléculaires donnés.

I. Mécanique Moléculaire

1. Fonction d'énergie potentielle

La plupart des modèles moléculaires sont basés sur l'utilisation d'une fonction d'énergie potentielle empirique (V), qui est fonction des coordonnées atomiques \mathbf{r}_i , où $i = 1, 2, 3 \dots N$, pour un système constitué de N atomes. La fonction d'énergie potentielle (ou champ de forces) est définie comme étant l'ensemble des différents termes traduisant les interactions physiques inter- et intramoléculaires du système, les atomes étant assimilés à des points massiques (éventuellement chargés) et les liaisons covalentes à des ressorts.

La fonction d'énergie potentielle généralement utilisée pour l'étude des protéines et en particulier par le programme CHARMM (Chemistry at HARvard Molecular Mechanics) (Brooks *et al.* 1983) est constituée de termes internes, liés à la structure covalente des molécules (interactions liantes), et de termes externes traduisant les interactions entre atomes non liés de manière covalente (interactions non liantes).

La forme de cette fonction s'écrit donc :

$$V(R) = V_{liantes} + V_{non\ liantes}$$

avec

$$V_{liantes} = V_{liaisons} + V_{angles} + V_{impropres} + V_{dièdres}$$

$$V_{liantes} = \sum_{liaisons} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{angles} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{impropres} k_\omega (\omega - \omega_0)^2 + \sum_{dièdres} k_\phi^n (1 + \cos(n\phi - \delta))$$

et

$$V_{non\ liantes} = V_{van\ der\ Waals} + V_{électrostatiques}$$

$$V_{non\ liantes} = \sum_{i,j} 4\varepsilon_{ij} \left(\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right) + \sum_{i,j>i} \frac{q_i q_j}{4\pi\varepsilon r_{ij}}$$

La forme complète de la fonction d'énergie potentielle de CHARMM est donc :

$$V(R) = \sum_{\text{liaisons}} k_b (b - b_0)^2 + \sum_{\text{angles}} k_\theta (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{\text{impropres}} k_\omega (\omega - \omega_0)^2$$

$$+ \sum_{\text{dièdres}} k_\varphi^n (1 + \cos(n\varphi - \delta)) + \sum_{i,j} 4\varepsilon_{ij} \left(\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right) + \sum_{i,j>i} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon r_{ij}}$$

Les interactions liantes font référence aux interactions entre atomes séparés par moins de 3 liaisons covalentes. Dans cette équation, les 2 premiers termes représentent la déformation des longueurs des liaisons covalentes, et des angles formés de deux liaisons covalentes. Le 3ème terme représente les variations d'angles impropres (non descriptibles par le terme précédent). Ces 3 premiers termes sont qualifiés de durs car un faible déplacement par rapport aux valeurs de référence induit d'importantes variations d'énergie. Le 4ème terme représente la torsion autour d'une simple liaison covalente (*Figure 35*).

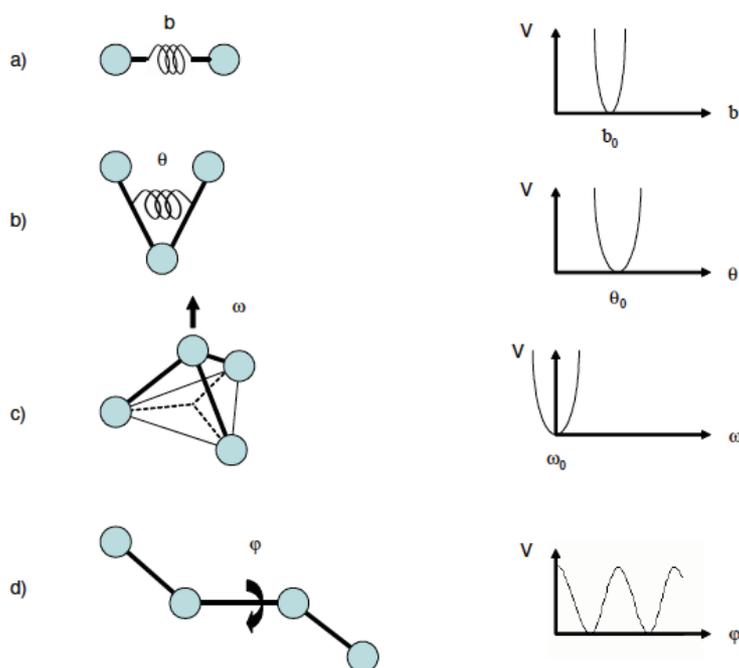


Figure 35 : Différents termes de la fonction d'énergie potentielle pour les interactions liantes : a) liaisons, b) angles, c) angles impropres et d) torsions dièdres.

Enfin les deux derniers termes représentent les interactions entre atomes non liés de manière covalente, c'est à dire séparés par plus de 3 liaisons covalentes. Le cinquième terme, appelé potentiel

de Lennard-Jones, traduit les interactions de type van der Waals. Il comporte un terme répulsif en r^{-12} traduisant la répulsion internucléaire à courte distance, et un terme attractif en r^{-6} représentant les interactions dipolaires dues aux fluctuations des nuages électroniques de chacun des atomes. Le dernier terme est le potentiel coulombien qui traduit les interactions électrostatiques entre les différentes paires d'atomes distantes de r_{ij} où ϵ représente la constante diélectrique du milieu. Pour le vide, $\epsilon = 1$, ; pour l'eau $\epsilon = 80$. Le fait d'introduire une constante diélectrique donnée permet de mimer le solvant de manière implicite. Lorsque le solvant est traité de manière explicite, la constante diélectrique doit être égale à 1. Ces deux derniers termes permettent également de représenter les liaisons hydrogène qui sont elles aussi des interactions non liantes.

2. Traitement des interactions non liantes

Afin de pouvoir diminuer l'effort calculatoire, en particulier dans le cas de grands systèmes, on a souvent recours à une approximation qui consiste à réduire le calcul des interactions non liantes d'un atome à ses plus proches voisins situés dans une sphère de rayon r_c appelé communément rayon de coupure (*cut-off*). Afin d'éviter certains artéfacts de simulation liés à une cessation brutale des interactions à la distance r_c , on multiplie les termes d'interaction non liantes par une fonction amenant doucement le potentiel (ou la force) à 0 entre deux valeurs r_{on} et r_{off} (Figure 36). Les valeurs de r_{on} et r_{off} doivent être judicieusement choisies car elles influencent de manière non négligeable les propriétés du système étudié (Loncharich and Brooks 1989; Steinbach and Brooks 1994).

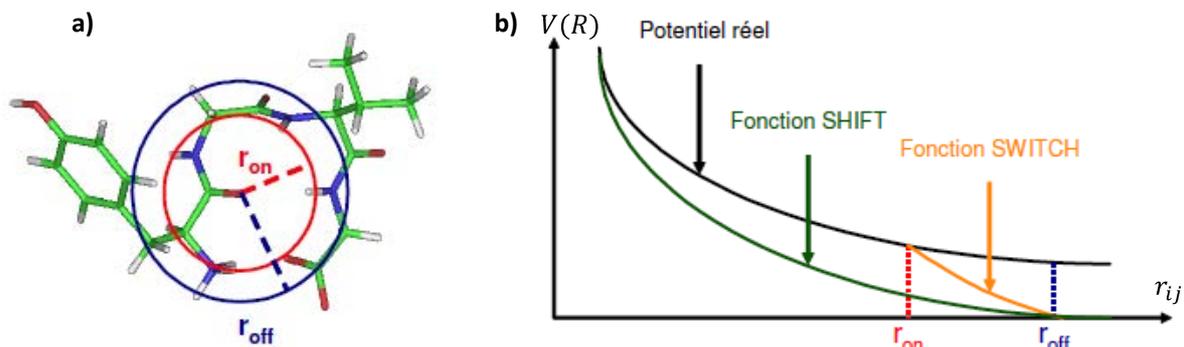


Figure 36 : Traitement des interactions non liantes

D'autres méthodes ont été développées pour le traitement des interactions non liantes, en particulier la méthode de sommation d'Ewald (Ewald 1921) qui est l'une des plus couramment utilisée. Elle permet de calculer les interactions électrostatiques d'un atome de charge q_i avec tous les autres atomes du système, ainsi qu'avec toutes ses images périodiques.

Il n'y a donc plus de troncature des interactions électrostatiques ce qui permet d'avoir une meilleure modélisation de ce type d'interaction. "Particle Mesh Ewald" est une implémentation efficace de cette méthode de calcul (Darden *et al.* 1993; Essmann *et al.* 1995) qui a été introduite dans CHARMM, mais elle demande un effort calculatoire beaucoup plus important qu'une méthode basée sur une simple troncature des interactions.

3. Traitement du solvant

Le comportement des macromolécules biologiques est fortement influencé par leur environnement, et en premier lieu par le solvant dans lequel elles baignent. La prise en compte de tels effets lors des calculs de modélisation moléculaire pose encore des problèmes majeurs. L'approche la plus précise consiste en effet en une représentation explicite de plusieurs milliers de molécules de solvant, ce qui alourdit considérablement les calculs à effectuer. D'autres méthodes, mimant la présence de solvant de manière implicite, sont toutefois disponibles, mais restent, pour les plus simples et les plus rapides, peu réalistes.

3.1. Solvation implicite

La manière la plus simple de traiter un solvant consiste à donner à la constante diélectrique ϵ du potentiel coulombien, une valeur correspondant à celle du solvant que l'on souhaite simuler. Ainsi, pour représenter l'eau, on utilisera une constante diélectrique de 80, tandis que pour mimer l'intérieur d'une protéine, on fixera ϵ entre 3 et 4. D'autres méthodes plus sophistiquées, basées sur des modèles empiriques ou sur un continuum électrostatique sont également disponibles, de plus en plus performantes, et beaucoup plus réalistes que le modèle précédent. Toutefois, dans le cadre de nos simulations réalisées sur les peptides d'élastine, les calculs effectués avec différents modèles de solvation implicite parmi les plus récents, ont montré des résultats assez différents donc difficilement interprétables, et des énergies peu stables. Nous avons donc préféré réaliser toutes nos simulations en solvant explicite, malgré des temps de calcul nettement supérieurs.

3.2. Solvation explicite

Traiter le solvant de manière explicite consiste à introduire explicitement toutes les molécules de solvant nécessaires autour du système moléculaire (soluté) que l'on souhaite

simuler. Cela implique de définir une boîte de solvant (cubique, parallélépipédique, ...) de taille suffisante pour y recevoir le soluté additionné d'une couche d'hydratation de 2 ou 3 molécules d'eau. Il est important ensuite que cette boîte de solvant ait une densité égale à la densité expérimentale, pour l'eau par exemple, on s'attachera à construire une boîte de solvant de densité 1. Enfin, il faut spécifier les paramètres physico-chimiques de la molécule de solvant en fonction du logiciel de modélisation moléculaire utilisé. Dans notre cas, nous avons donc utilisé le modèle TIP3P (Jorgensen *et al.* 1983), tel qu'il est paramétré dans le logiciel CHARMM. Pour éviter des variations de densité au sein du système soluté-solvant dès qu'une molécule d'eau quitte la boîte, mais également pour éviter les effets de bord en périphérie de celle-ci, on applique des conditions périodiques aux limites (*Figure 37*) : on duplique le système dans toutes les directions de l'espace afin d'aboutir à 26 copies, appelées boîtes images.

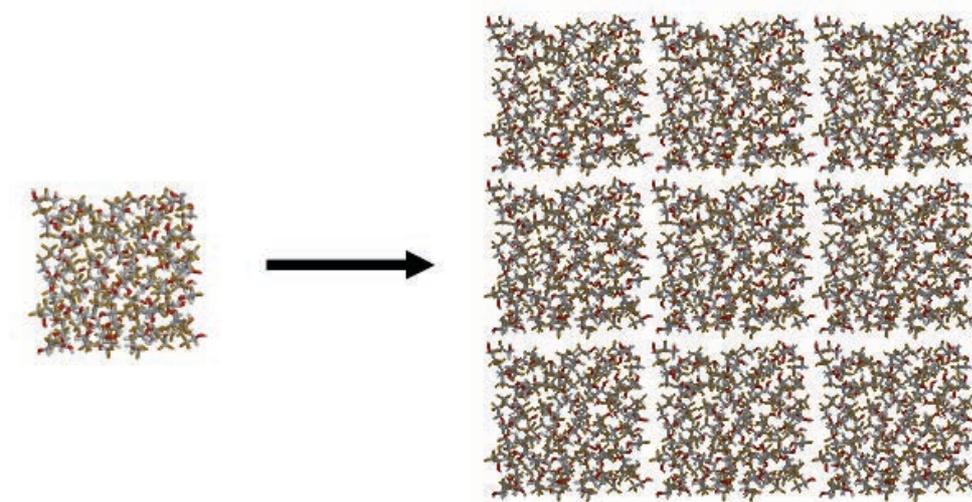


Figure 37 : Création des 26 images autour du système initial pour appliquer les conditions périodiques aux limites.

La fonction d'énergie potentielle n'est alors calculée que pour les atomes de la boîte centrale et leurs interactions éventuelles avec les atomes des boîtes images. Les mouvements qui apparaissent dans la boîte centrale sont automatiquement copiés dans les boîtes adjacentes : une molécule de solvant qui sort de la boîte centrale par un côté, revient dans cette même boîte par le côté opposé, ce qui permet de garder en permanence une densité constante dans la boîte principale. Dans la mesure où les molécules de solvant sont explicitement incluses, et contribuent donc à l'évaluation de l'énergie du système, on fixe la constante diélectrique du système à 1.

II. Dynamique Moléculaire

La dynamique moléculaire est une des techniques de modélisation moléculaire permettant de simuler l'évolution temporelle d'un système moléculaire. Connaissant la forme de la fonction d'énergie potentielle, on peut, en résolvant l'équation de Newton, obtenir un ensemble de trajectoires atomiques spécifiant à chaque instant la position et la vitesse de chacun des atomes et obtenir ainsi un ensemble de conformations successives

1. Principe

L'équation du mouvement, pour la i -ème particule d'une collection d'atomes, est donnée par la seconde loi de Newton :

$$\vec{F}_i = m_i \frac{d^2 \vec{r}_i}{dt^2} = m_i \vec{a}_i$$

où \vec{F}_i est la force s'exerçant sur l'atome i , due aux interactions avec les autres atomes, m_i sa masse et \vec{a}_i son accélération.

A partir de la position de l'atome i à l'instant t , $\vec{r}_i(t)$, et de la force $\vec{F}_i(t)$ s'exerçant sur ce même atome, on peut déterminer la position et la force à l'instant $t + \Delta t$ en effectuant un développement en série de Taylor (Algorithme de Verlet)(Verlet 1967) :

$$\begin{aligned} \vec{r}_i(t + \Delta t) &= \vec{r}_i(t) + \frac{d\vec{r}_i(t)}{dt} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} \Delta t^2 + \frac{1}{6} \frac{d^3 \vec{r}_i(t)}{dt^3} \Delta t^3 + o(\Delta t^4) \\ &= \vec{r}_i(t) + \vec{v}_i(t) \Delta t + \frac{1}{2} \vec{a}_i(t) \Delta t^2 + \frac{1}{6} \frac{d^3 \vec{r}_i(t)}{dt^3} \Delta t^3 + o(\Delta t^4) \end{aligned}$$

De même :

$$\begin{aligned} \vec{r}_i(t - \Delta t) &= \vec{r}_i(t) - \frac{d\vec{r}_i(t)}{dt} \Delta t + \frac{1}{2} \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} \Delta t^2 - \frac{1}{6} \frac{d^3 \vec{r}_i(t)}{dt^3} \Delta t^3 + o(\Delta t^4) \\ &= \vec{r}_i(t) - \vec{v}_i(t) \Delta t + \frac{1}{2} \vec{a}_i(t) \Delta t^2 - \frac{1}{6} \frac{d^3 \vec{r}_i(t)}{dt^3} \Delta t^3 + o(\Delta t^4) \end{aligned}$$

où $\vec{v}_i(t)$ et $\vec{a}_i(t)$ sont respectivement les vitesse et l'accélération de l'atome i à l'instant t

La combinaison des deux équations précédentes donne :

$$\vec{r}_i(t + \Delta t) = 2\vec{r}_i(t) - \vec{r}_i(t - \Delta t) + \vec{a}_i(t)\Delta t^2 + o(\Delta t^4)$$

et

$$\vec{v}_i(t) = \frac{\vec{r}_i(t + \Delta t) - \vec{r}_i(t - \Delta t)}{2\Delta t} + o(\Delta t^3)$$

L'algorithme de Verlet utilise les positions et accélérations des atomes du système à un temps t ainsi que les positions à l'instant $t - \Delta t$ afin de déterminer les nouvelles positions au temps $t + \Delta t$. Pour utiliser cet algorithme, nous devons donc connaître les positions et les vitesses initiales des différents atomes $\vec{r}_i(0)$ et $\vec{v}_i(0)$. Les coordonnées initiales peuvent provenir d'un modèle cristallographique ou de données théoriques calculées par différentes méthodes. Les vitesses initiales sont, elles, attribuées de façon aléatoire selon une distribution de Maxwell pour de faibles températures. On peut alors facilement déterminer la position suivante du système en appliquant la formule : $\vec{r}_i(\Delta t) = \vec{r}_i(0) + \vec{v}_i(0)\Delta t$. Ensuite, l'algorithme de Verlet ci-dessus peut être appliqué en déterminant les accélérations \vec{a}_i à partir des forces :

$$\vec{F}_i = \frac{dV}{d\vec{r}_i} = m_i\vec{a}_i$$

où V est la fonction d'énergie potentielle définie précédemment.

La valeur critique de ce type d'équation est la détermination du pas d'intégration Δt qui doit être rigoureusement choisi pour ne pas faire varier trop rapidement l'énergie potentielle du système. La valeur du pas d'intégration est en général de l'ordre de la femtoseconde (10^{-15} s), temps qui est inférieur à la période des mouvements les plus rapides à l'échelle atomique, c'est à dire les vibrations d'élongation d'une liaison X - H (avec X = C, N, O, S, ...). Toutefois, l'utilisation de contraintes appliquées à certaines liaisons, comme par exemple la procédure SHAKE, (Ryckaert *et al.* 1977), permet d'augmenter le pas d'intégration et ainsi de gagner en temps de calcul. A l'heure actuelle, il est généralement admis qu'utiliser l'algorithme SHAKE sur les liaisons mettant en jeu des atomes d'hydrogène permet l'utilisation d'un pas d'intégration de 2 fs.

Plus la valeur du pas d'intégration sera grande plus le temps de calcul sera diminué. Les calculs en modélisation moléculaire nécessitent un compromis entre le niveau de description utilisé : modèle quantique ou classique, solvation implicite ou explicite, valeur du pas

d'intégration, mais dépend surtout des moyens informatiques mis à disposition pour effectuer ces calculs.

2. Détails d'un protocole de simulation

2.1. Préparation du système

Comme cela a été expliqué précédemment il est nécessaire, avant de réaliser la simulation proprement dite, d'obtenir les coordonnées de l'ensemble des atomes du système. Pour le soluté, s'il s'agit d'une protéine par exemple, on utilisera les coordonnées cristallographiques ou bien un modèle obtenu par d'autres méthodes théoriques telles que la modélisation par homologie. Si la simulation est réalisée en solvant explicite, comme cela a été le cas pour nous, la molécule sera ensuite immergée dans la boîte de solvant, et les molécules d'eau situées à moins de 2,8 Å d'un atome lourd du soluté seront supprimées.

Une fois les coordonnées du système complet définies, la simulation va se dérouler en quatre étapes distinctes détaillées ci-dessous. Nous avons réalisé toutes nos simulations dans l'ensemble microcanonique NVE, c'est-à-dire que le nombre d'atomes N , l'énergie totale E et le volume V doivent rester constants tout au long de la trajectoire

2.2. Minimisation

Dans un premier temps, l'énergie totale du système doit être minimisée de manière à éliminer certains mauvais contacts inter- ou intramoléculaires susceptibles de perturber la simulation. Dans le cas d'une solvatation explicite, la minimisation est effectuée en plusieurs temps : dans un premier temps, seul le soluté est minimisé (le solvant étant fixé), puis le solvant seul à son tour (le soluté étant fixé). Ceci est répété une deuxième fois avant de minimiser l'ensemble du système soluté-solvant. La structure ainsi obtenue correspond à un point d'énergie minimum sur l'hypersurface d'énergie potentielle pour une température théorique de 0 K.

2.3. Chauffage

Les simulations étant réalisées à 300 K, il est nécessaire d'apporter progressivement et uniformément de l'énergie cinétique au système de manière à atteindre la température finale désirée. Pour cela, on attribue aléatoirement, suivant une distribution de Boltzmann, une

vitesse à chaque atome à des intervalles de temps réguliers. La température est en effet reliée aux vitesses par la relation :

$$E_{cin} = \sum_{i=1}^N \frac{1}{2} m_i v_i^2 = \frac{3N}{2} k_B T$$

où v_i est la vitesse de l'atome i , m_i sa masse, k_B la constante de Boltzmann et T la température.

2.4. Equilibrage

Lorsque la température de simulation est obtenue, une phase d'équilibrage est nécessaire afin de stabiliser l'énergie et la température du système. Dans nos simulations, la phase d'équilibrage a été réalisée en deux parties. Pendant la première étape, le champ de vitesses est ajusté par ajout d'une distribution de vitesses gaussienne, comme pour le chauffage. En revanche, lors de la seconde phase, la température est contrôlée par rapport à la température de consigne (300 K) et le champ de vitesse n'est ajusté par « scaling » que si la température sort de la fenêtre de contrôle (± 10 K). Cet ajustement uniforme et proportionnel évite les variations trop brutales des vitesses et donc de la température. Lorsque le système est stable, la phase de production peut commencer.

2.5. Production

Au cours de cette phase, le système évolue librement, sans contrainte. C'est durant cette phase que la simulation proprement dite s'effectue dont on extraira les informations structurales et dynamiques concernant le système étudié. Avant toute analyse, il faut s'assurer que la simulation s'est déroulée dans de bonnes conditions et que la température et l'énergie totale du système sont restées stables tout au long de la production (*Figure 38*). Dans le cas contraire, cela signifie qu'une erreur a été commise ou qu'il existe une incompatibilité entre les paramètres de simulation : phase d'équilibrage trop courte, pas d'intégration trop grande,

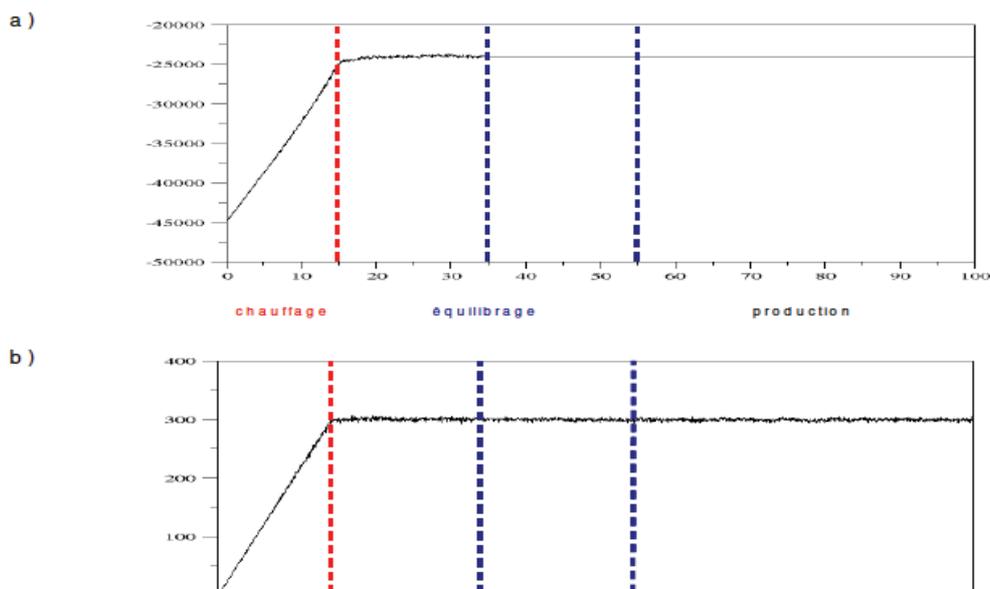


Figure 38 : Suivi a) de l'énergie totale et b) de la température du système durant les différentes phases de la dynamique moléculaire.

3. Analyse

A la suite d'une simulation de dynamique moléculaire on analyse la ou les trajectoire(s) obtenue(s) dont on extrait des informations structurales, dynamiques ou thermodynamiques d'intérêt.

3.1. Séries temporelles

Le module CORREL de CHARMM permet d'extraire des séries temporelles à partir des trajectoires de dynamique moléculaire. Il est ainsi possible de suivre l'évolution de certains paramètres en fonction du temps, tels que la distance entre deux atomes, les valeurs de certains angles dièdres, la présence de liaisons H, etc.

3.2. Analyse des coudes β

Comme détaillé précédemment (paragraphe II.1.2.3), un coude β de type IV est un coude pour lequel les valeurs de ses angles ne lui permettent pas d'être classé dans un des types prédéfinis (I, I', II, II', VIa1, VIa2, VIb et VIII). Il est cependant intéressant de savoir de quel type de coude il se rapproche le plus. Pour ce faire, un petit programme a été mis au point au laboratoire permettant de calculer dans l'espace des angles dièdres une distance euclidienne (D) entre le coude de type IV observé et chacun des coudes canoniques. Cette distance est définie par :

$$D = \sqrt{\Delta_{\varphi(i+1)}^2 + \Delta_{\psi(i+1)}^2 + \Delta_{\varphi(i+2)}^2 + \Delta_{\psi(i+1)}^2}$$

avec $\Delta_{\varphi(i+1)} = \varphi(i+1)_{\text{observé}} - \varphi(i+1)_{\text{canonique}}$

Ainsi, plus la distance euclidienne sera faible, plus le coude observé sera proche du type canonique correspondant. Il est très important de calculer cette valeur dans notre cas. En effet, les peptides étudiés ici sont de très petite taille les rendant extrêmement flexibles, il n'est donc pas rare d'observer au cours de nos trajectoires de nombreux coudes de type IV.

III. Docking Moléculaire

L'interaction entre un substrat et une protéine est une étape primordiale dans la plupart des réactions biologiques. Il est donc important de bien comprendre les mécanismes de l'interaction et de déterminer les résidus mis en jeu. En règle générale, les substrats et/ou inhibiteurs sont appelés « ligands », alors que leur cible est appelée « récepteur ».

Afin de prédire l'interaction entre le ligand et son récepteur, des outils de docking ont été développés, leur but étant d'obtenir un ensemble de conformations de plus basses énergies représentant l'interaction du complexe. Ces programmes reposent sur une fonction de score et sur différentes méthodes permettant d'obtenir le minimum global d'énergie d'interaction : minimisations d'énergie, recuits simulés, méthodes de Monte-Carlo, algorithmes génétiques, ... Dans notre étude nous avons utilisé le logiciel AutoDock (Automated Docking of substrates to proteins by simulated annealing) (Goodsell and Olson 1990) dans lequel l'espace conformationnel du ligand est exploré via la rotation aléatoire de certains angles dièdres, tout en maintenant fixe le récepteur.

1. Principe

La suite logicielle AutoDock regroupe trois programmes principaux : le programme **AutoTors**, qui définit les angles dièdres qui seront modifiés aléatoirement et permettront d'échantillonner l'espace conformationnel du ligand ; le programme **AutoGrid** qui effectue le calcul des différentes grilles d'affinité pour le récepteur ; et enfin le programme **AutoDock** qui réalise les calculs de docking proprement dits sur l'ensemble des grilles d'affinité précédemment calculées. Ces programmes peuvent tous être utilisés via une interface graphique « ADT » (AutoDock Tools) développée par la même équipe qui a créé la suite AutoDock. Cette interface permet notamment de visualiser les grilles à l'intérieur desquelles

vont être réalisés les calculs de docking, de préparer les différents scripts utilisés par les différents programmes, et enfin d'analyser les structures des différents complexes obtenus.

La première étape consiste à préparer le ligand et le récepteur en définissant les charges partielles de leurs atomes. AutoTors permet ensuite de définir un centre de masse pour les mouvements globaux (rotations et translations) du ligand ainsi que l'ensemble des liaisons « rotables » du ligand permettant l'exploration de son espace conformationnel.

Afin d'augmenter la vitesse d'évaluation de l'énergie du système, une grille tridimensionnelle est construite autour du récepteur par le programme AutoGrid. La taille de cette grille est définie en fonction du nombre de nœuds ou points n_x, n_y, n_z constituant cette grille et de l'espacement entre eux-ci. Des atomes sondes (généralement C, H, O, N) sont ensuite placés à chaque nœud de la grille afin de calculer l'affinité entre les atomes et le récepteur. Ceci est effectué pour chaque type d'atomes constituant le ligand.

Une seconde grille, de potentiel électrostatique, est également calculée, par résolution de l'équation de Poisson-Boltzmann. Ceci va permettre de diminuer les temps de calculs de plus de cent fois. En effet, sans cela, il serait nécessaire de lister toutes les interactions non liantes entre le ligand et son récepteur à chaque modification de la position ou de la structure du ligand.

La taille des mailles de la grille est fixée par défaut à 0,375 Å par AutoGrid. Cette taille de maille correspond au quart de la longueur d'une simple liaison entre deux atomes de carbone. Cette distance peut néanmoins être ajustée à la longueur désirée. Dans notre étude, nous avons fixé la taille de la maille de la grille à 0,2 Å (*Figure 39*).

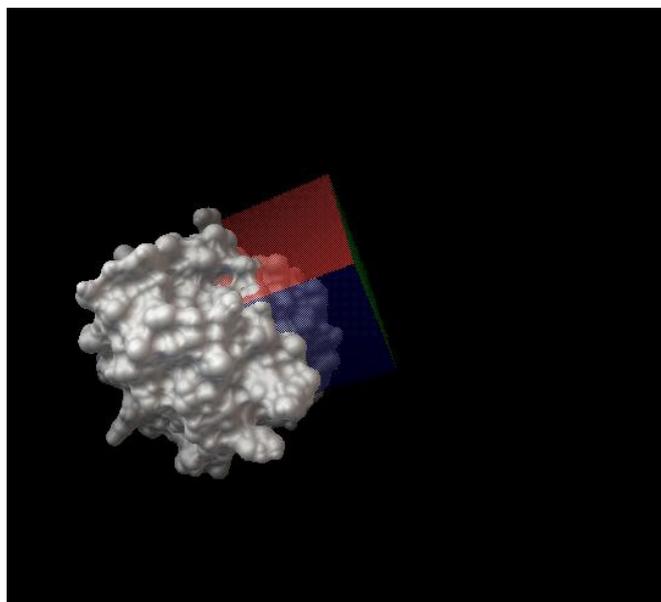


Figure 39 : Représentation d'une grille de $126 \times 126 \times 126$ points construite avec AUTOGRID au niveau du site d'interaction avec un pas de $0,2 \text{ \AA}$

Un algorithme de Lamarck (Morris *et al.* 1998) est ensuite utilisé afin de réaliser automatiquement l'échantillonnage des structures, des positions et des orientations du ligand par rapport à son récepteur. En fonction de la structure du ligand et de sa place vis-à-vis du récepteur, AutoDock va évaluer son affinité à partir d'une fonction de score basée sur une forme empirique de l'énergie libre d'interaction ligand-récepteur :

$$\Delta G_{interaction} = \Delta G_{van\ der\ Waals} + \Delta G_{électrostatique} + \Delta G_{liaison\ H} + \Delta G_{desolvation} + \Delta G_{torsion}$$

Les trois premiers termes correspondent aux termes classiques de mécanique moléculaire, à savoir d'attraction et de répulsion entre atomes, d'interaction électrostatique et de liaisons hydrogène. Le quatrième terme correspond aux effets hydrophobes et de désolvation induits par la fixation du ligand à son récepteur. Enfin, le dernier terme rend compte des mouvements internes du ligand.

L'utilisateur définit au préalable un nombre de cycles (expériences indépendantes), comportant chacun un nombre de pas (nombre d'évaluations de l'énergie d'interaction). A chaque pas, la position et/ou la conformation du ligand est (sont) changée(s). La meilleure solution en termes d'énergie d'interaction est conservée à l'issue de chaque cycle et l'ensemble des conformations ainsi obtenues analysées et regroupées en familles de conformations (clusters) d'après leur RMSD (Root Mean Square Deviation). Le RMSD

caractérise l'écart quadratique moyen entre deux structures, c'est-à-dire qu'il rend compte de la déformation spatiale qui existe entre elles. Il est défini de la manière suivante :

$$RMSD(i, j) = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{n=1}^N \|\vec{r}_{i,n} - \vec{r}_{j,n}\|^2}$$

où N est le nombre d'atomes du système et $\vec{r}_{i,n}$, la position de l'atome n dans la conformation i et $\vec{r}_{j,n}$, la position de l'atome n dans la conformation j

2. Analyse des résultats

Les résultats obtenus avec AutoDock peuvent être analysés de deux façons via ADT : en regardant les conformations obtenues classées par énergies croissantes, les premières conformations proposées correspondant aux structures de plus basse énergie, donc a priori aux modes d'interaction les plus favorables. Toutefois, de nombreuses conformations sont proposées parmi lesquelles certaines sont très proches les unes des autres, même si parfois leur énergie varie quelque peu. Le programme regroupe alors l'ensemble des conformations obtenues par clusters, lesquels sont constitués à partir des RMSD des différentes structures calculées 2 à 2. Pour l'ensemble de nos calculs, une valeur seuil du RMSD pour le calcul de ces clusters a été fixée à 1 Å. Les clusters ainsi obtenus sont représentés sous forme d'histogrammes (*Figure 40*). Les clusters de plus basse énergie correspondent donc aux conformations les plus favorables.

Une fois le choix du modèle d'interaction arrêté, l'étude de la formation de liaisons hydrogène entre le ligand étudié et sa cible peut nous renseigner sur la stabilité du complexe ainsi formé.

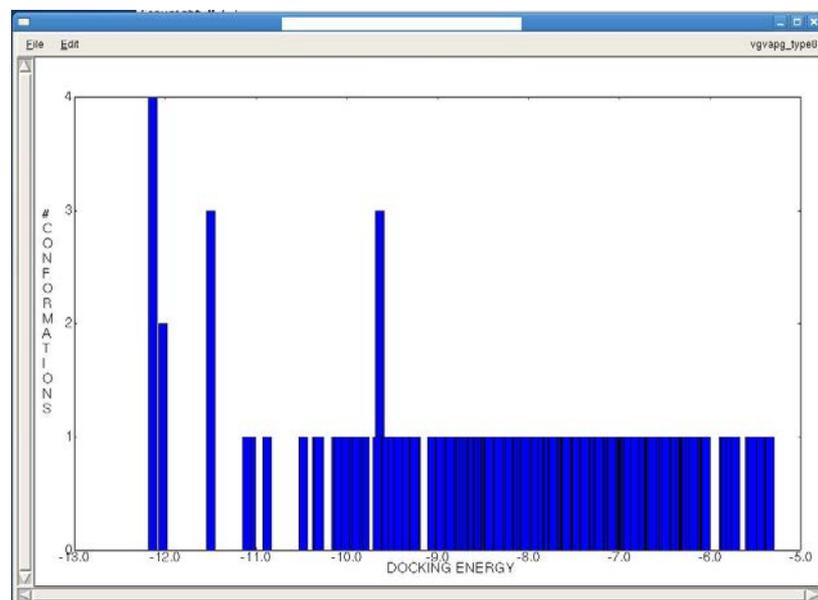
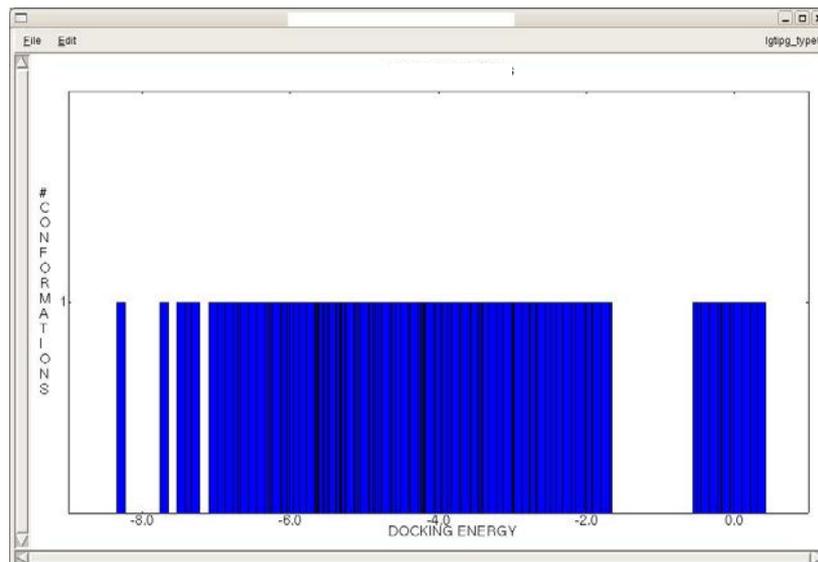


Figure 40 : Classement des conformations de plus basses énergies par cluster.

- a) Histogramme d'un ligand présentant des clusters de taille identique. b) Histogramme d'un peptide présentant des clusters de basse énergie plus ou moins peuplés. Un cluster de plus basse énergie fortement peuplé pourrait indiquer une interaction particulièrement favorable.

PARTIE 4 : Résultats

I. Induction and regulation of murine emphysema by elastin peptides

La BPCO est une pathologie pulmonaire d'évolution lente caractérisée par une réponse inflammatoire chronique et une détérioration irréversible des petites voies aériennes et du

parenchyme pulmonaire. L'emphysème est la forme principale de la BPCO et l'exposition à la fumée de tabac en est le principal facteur étiologique. La réponse inflammatoire au cours de la BPCO est caractérisée par une infiltration massive du tissu respiratoire par les Polynucléaires Neutrophiles (PN) et les macrophages. Le nombre de PN et de macrophages dans les lavages bronchoalvéolaires (LBA) et les biopsies bronchiques est corrélé avec le degré de sévérité de la BPCO. L'activation des cellules inflammatoires au cours de la BPCO, et en particulier des PN, conduit à la sécrétion de nombreuses protéases telles que des sérines protéases spécifiques du PN (NE, cathepsine G, protéinase 3), et des métallo-protéinases matricielles (MMP 2, 7, 9 et 12). Ces protéases participent à l'installation et à l'entretien de la réponse inflammatoire chronique ainsi qu'à la genèse des lésions tissulaires observées au cours la pathologie.

La majorité des protéases sécrétées au cours de la BPCO sont également impliquées dans la dégradation du tissu conjonctif du parenchyme pulmonaire ou l'élastine est la cible privilégiée de la NE et de la MMP-12. La forte excrétion de desmosine, marqueur spécifique de la dégradation de l'élastine, et les taux élevés de peptides d'élastine (PE) dans différents liquides biologiques (urine, sang, plasma, expectorations) ont permis de mettre en évidence une dégradation intense de l'élastine pulmonaire chez les patients atteints de BPCO. Par ailleurs, le niveau de NE dans les LBA de patients atteints d'emphysème est corrélé avec le niveau de PE dans ces mêmes fluides. L'effet des PE est associé à la présence du motif GXXP dans les peptides et à l'adoption d'une conformation en coude β de type VIII par le peptide.

Nous avons effectué, à partir des peptides VGVAPG et PGAIPG, des mutations systématiques des résidus centraux de GXXP afin de déterminer les peptides les plus favorablement repliés en coude beta de type VIII et nous avons sélectionné les meilleurs candidats pour la fixation à l'EBP. Nous avons retenu les peptides interagissant avec l'EBP tout en ne montrant que peu ou pas d'effets biologiques. Leur potentiel pouvoir antagonistes des effets du peptide VGVAPG a été évaluée *in vitro* et *in vivo*.

Les principaux résultats obtenus au cours de cette étude sont les suivants :

1/ L'instillation intratrachéale de VGVAPG à des souris, conduit à la mise en place d'un

emphysème semblable à celui retrouvé lors de l'instillation d'enzyme pancréatique porcine (PPE) décrit dans la littérature comme responsable d'un emphysème chez la souris. Les souris contrôles (instillation de PBS) ne développent pas d'emphysème. L'emphysème observé se caractérise par une destruction du tissu pulmonaire et de la MEC, une accumulation dans les LBA et le parenchyme pulmonaire de cellules inflammatoires (PN et macrophages) et une augmentation de la production de protéases de type MMP-2, -9 et 12. Un effet emphysémateux similaire est observé par instillation de PGAIPG.

2/ Le VGVAPG et le PGAIPG nécessitent un repliement en coude β de type VIII pour se lier au récepteur à l'élastine. La glycine en position N-terminale semble nécessaire à leur activité. En conséquence, nous avons étudié le comportement des peptides VGVAP et PGAIP en simulation de Dynamique Moléculaire et en simulation de Docking Moléculaire. Nous avons montré que le peptide PGAIP présente une grande propension à se replier en coude β de type VIII et semble un bon candidat pour se fixer au récepteur de l'élastine. Cet effet n'est pas retrouvé pour le peptide VGVAP.

3/ L'instillation intratrachéale de PGAIP à des souris saines n'induit pas les effets observés après administration du PGAIPG ou du VGVAPG. Par ailleurs, une instillation simultanée de PGAIP et de VGVAPG entraîne une protection partielle des souris vis-à-vis de l'emphysème induit par le VGVAPG. Le PGAIP ne semble pas être en mesure d'inhiber totalement les effets du VGVAPG. En effet on peut observer une légère infiltration de PN, ainsi qu'une expression de MMP-2 et une augmentation de la taille des alvéoles. Le peptide PGAIP semble agir comme un antagoniste partiel des effets des peptides d'élastine.

Les résultats obtenus dans ce travail montre le rôle essentiel des peptides d'élastine dans la pathogénèse de la BPCO et ouvrent la voie à la sélection de nouvelles molécules à visées thérapeutiques pour limiter les réguler les effets délétères des peptides d'élastine au cours de cette pathologie.

Induction and regulation of murine emphysema by elastin peptides

Mehdi Sellami,¹ Aïda Meghraoui,¹ Christine Terryn², Caroline Fichel³,
Nicole Bouland³, Marie-Danièle Diebold³, Stéphanie Héry-Huynh,^{1*}
Richard Le Naour^{1*}

Affiliations

¹ EA4683, SFR CAP-Santé, Université de Reims Champagne-Ardenne, Reims, France

² Plateforme d'Imagerie Cellulaire et Tissulaire, SFR CAP-Santé, URCA, Reims, France

³ Laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, CHU R. Debré, Reims, France

* These authors equally contributed to this work

Address correspondence to : Dr Richard Le Naour, EA4683 "Immunité Adaptative et Fonctionnalité des Barrières Biologiques", UFR de Pharmacie, 1 rue du Maréchal Juin 51096 Reims Cedex, France; Phone: 33 326 918 144 ; Fax: 33 326 913 72 ; E-mail : richard.lenaour@univ-reims.fr

Abstract

Emphysema is the major component of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and is characterized by airspace enlargement, accompanied by alveolar extracellular matrix destruction. The breakdown of elastin in the lung connective tissue during emphysema occurs because of the release of large quantities of elastase by inflammatory cells recruited to the lungs. Elastin derived-peptides produce during elastase-induced murine pulmonary emphysema or instilled in the lungs of mice elicit recruitment and accumulation of inflammatory cells in alveolar parenchyma. Among elastin derived-peptides, only those containing the GXXPG conformation and a type VIII β -turn on the GXXP motif can display biological activities. In this study, we endotracheally administrated a single dose of the active hexapeptide VGVAPG and we investigated its impact on all the criteria associated with the progression of pulmonary emphysema in mouse. Emphysema was observed histologically at 21 days after VGVAPG treatment and tissues from exposed mice exhibited inflammatory cell accumulation associated with expression of MMPs-2, -9 and -12 in BAL fluids, enlargement of alveolar spaces and degradation of collagen and elastin fibers. The VGVAPG-dependent emphysema was strongly but partially attenuated in mice when the analog peptide PGAIP, identified by molecular dynamic and docking simulations, was co-administrated with the VGVAPG peptide. This study demonstrates that exposure of mice to elastin peptides elicited hallmark features of emphysema. This study also evidences that our short-term mouse model of elastin peptides-induced emphysema can be used to evaluate and validate new pharmacological approaches, based on the identification of elastin peptide antagonists by molecular modelisation studies, to resolve lung emphysema.

Introduction

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is the fourth most common cause of chronic morbidity and death worldwide, and its prevalence is increasing (1). Patients with COPD have chronic bronchitis, with obstruction of small airways, and emphysema, characterized by alveolar extracellular matrix destruction leading to progressive airflow limitation. This limitation is associated with an abnormal inflammatory response of the lung to noxious particles or gases (2). The inflammatory process occurring during COPD is characterized by the secretion of large quantities of proteases by lung-infiltrating inflammatory cells (3), exceeding the protease inhibitor defenses of the lung. This phenomenon is the basis of the well-described protease-antiprotease hypothesis (4). Some of these proteases (neutrophil elastase, MMP-2 and 9) promote breakdown of elastin, a protein constituted of tropoelastin molecules covalently bound (5) and responsible for pulmonary elasticity (3, 6). Accordingly, increased excretion of desmosine, a specific marker of elastin degradation (7), and elevated levels of elastin-derived peptides in various biological fluids reflect massive pulmonary elastin breakdown in COPD patients (8-10).

Elastin-derived peptides display biological activities such as chemotactic activity, regulation of cell proliferation and cytokine expression, or protease release in a wide type of cells (11-17). All these biological effects are carried by the hexapeptide VGVAPG which is six times contained within hydrophobic domains of tropoelastin and the chief ligand for high affinity binding to elastin receptor (18, 19). The elastin receptor complex is a heterodimer including a 67-kDa elastin-binding protein (EBP) identified as an enzymatically inactive spliced variant of the human β -galactosidase designed as Spliced-galactosidase (S-gal) (20-22). Besides its elastin binding site, EBP also contains a β -galactosugar binding site whose binding causes its shedding from the cell surface (23) and therefore elastin receptor inactivation. Among elastin-derived peptides, only those containing the GXXPG

conformation such as VGVAPG (12, 14) but also PGAIPG (16, 24), GVAPGV (16) or GLVPG (25), have been identified as the ligands of EBP leading to biological effects. Using molecular dynamic stimulations, we and others have demonstrated that the high propensity of active elastin-derived peptides to exhibit a type VIII β -turn on the GXXP motif is a key event for anchoring to EBP (26-29). Interestingly, the presence of the N-terminal glycine residue after the GXXP motif seems to be necessary for the biological activity (16). Therefore, it should be reasonable to hypothesize that an analog peptide generated by deletion of the C-terminal glycine residue of active elastin peptides and maintaining a type VIII β -turn spanning the GXXP sequence could be a good antagonist peptide blocking the elastin binding site of EBP.

Pulmonary exposure to porcine pancreatic elastase (PPE) contributes in rodents to acute lung inflammatory response and parenchyma destruction, followed by compromised lung function whose traits closely resemble to human emphysema (30-33). PPE-induced emphysema is associated with an elastin catabolism *in vivo* (34) and macrophages accumulation and development of airspace pathology are abrogated in PPE-recipient mice receiving monoclonal antibodies directed against elastin fragments over the time course of experiment (33). In addition, intra-tracheal instillation of VGVAPG induces a recruitment of peripheral blood monocytes to the lungs of mice, with an increase in tissue macrophage content similar to that present after the administration of PPE (33). An alteration in collagen synthesis also appears during the development of elastase-induced emphysema (35).

In this study, we postulated that pulmonary exposure of WT mice to elastin peptides might induce major characteristics of emphysema, and we undertook to test this hypothesis by determining whether such emphysema would be modulated using EBP-specific antagonist peptides. We performed an extensive analysis of a single endotracheal instillation of VGVAPG on pro-inflammatory response and connective tissue changes in the lungs of mice. In addition, we performed molecular modeling studies in order to generate, from well-known

active XGXXPG elastin peptides, analog peptides obtained after deletion of the C-terminal glycine residue and exhibiting a high propensity to fold into a type VIII β -turn structure on the GXXP sequence. We found that exposure of mice to VGVAPG elicited hallmark features of emphysema with acute and chronic lung inflammatory response and remodeling of parenchyma tissue with airspace enlargement. We also identified the peptide PGAIP as an inactive elastin peptide able to interact to the elastin binding site on EBP and to inhibit or reduce VGVAPG effects both *in vitro* and *in vivo*.

Results

Exposure of C57BL/6J mice to VGVAPG induces the hallmark features of pulmonary emphysema. We delivered one single dose of VGVAPG (10 µg) into the trachea of WT C567BL/6 mice and we performed differential cell counts on BAL fluid and pulmonary tissue obtained on days 1, 3, 7, 14 and 21 following instillation. Exposure to VGVAPG led to acute inflammation in the airways characterized by increased macrophage and neutrophil numbers in the BAL fluid (Figures 1A and 1B). This inflammatory cell infiltrate that peaked at 1 day after instillation and significantly persisted until seventh day was similar to that obtained by administration of a single dose of PPE (7.4 µg). As noted, PBS and scrambled peptide (SP, 10 µg) showed no effect on cell numbers in the BAL fluid. VGVAPG exposure also induced progressive chronic parenchymal inflammation. A significant increase in lung macrophages and neutrophils was evidenced on immunofluorescent specific markers stained sections (Figures 1C and 1D). VGVAPG causes accumulation of macrophages and neutrophils early as one day after instillation consistent with the results of cell counts in BAL fluid. Both numbers continued to increase to reach stable rates around 7 or 14 days. This VGVAPG-dependent parenchymal inflammation was associated with a breakdown of lung elastin and collagen as determined by auto-fluorescent analysis of elastic and collagen fibers at the 21-day time point (Figure 1E). In contrast, lungs of PBS- or SP-treated mice showed a normal distribution of both elastin and collagen. This airway remodeling was accompanied by an airspace enlargement highly present after 21 days (Figure 1F). Mean linear intercept values, representative of the size in alveolar space, were higher in both VGVAPG and PPE-treated mice, while no effect was seen in PBS or scrambled peptide-treated groups (Figure 1G).

Figure 1

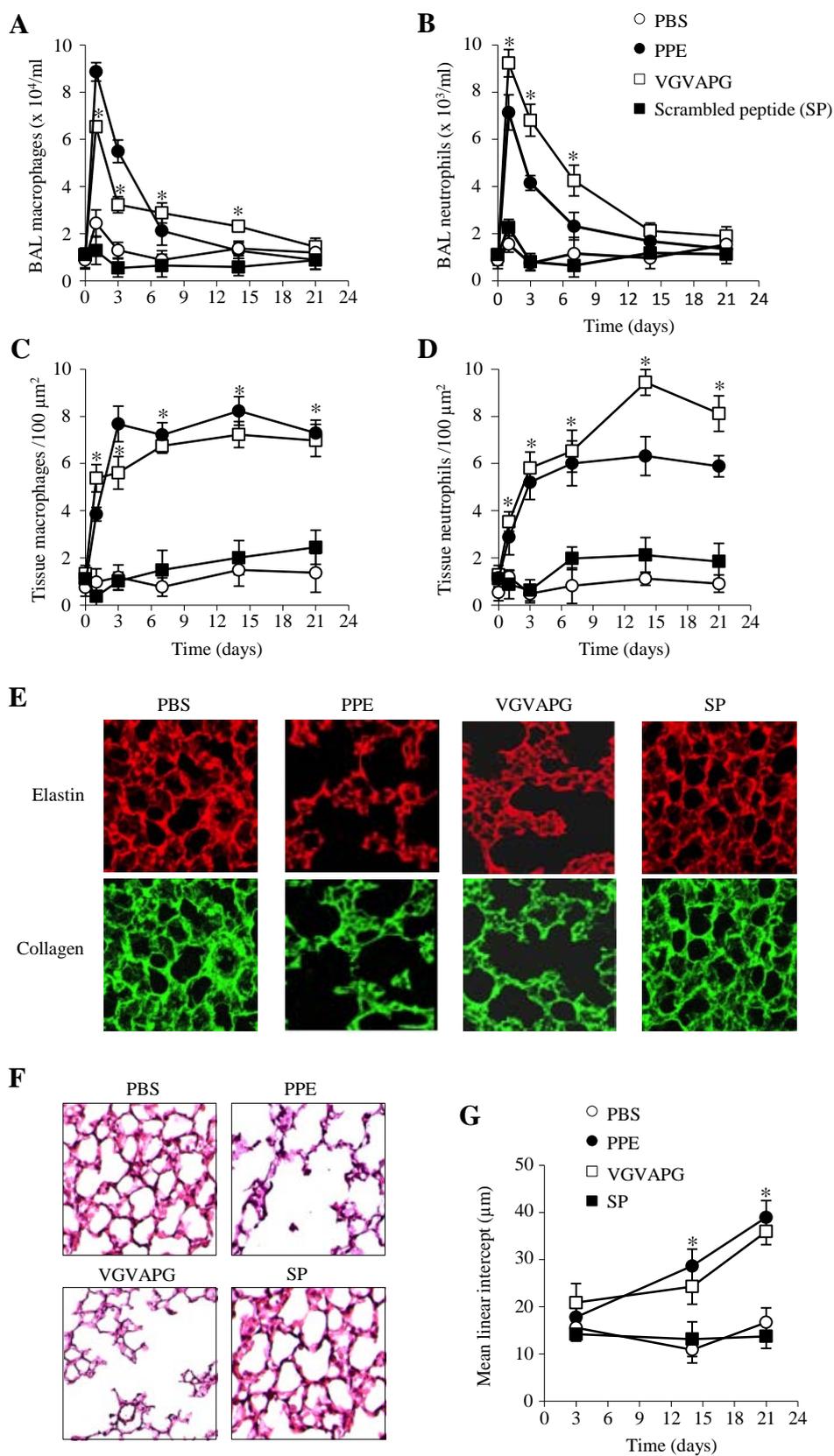


Figure 1. Exposure of C57BL/6J mice to VGVAPG induces the hallmark features of pulmonary emphysema. **(A to D)** Macrophage and neutrophil numbers measured in the BAL fluids **(A and B)** and in the pulmonary tissue **(C and D)** of mice exposed to PBS, PPE, VGVAPG or Scrambled Peptide (SP) for 1 to 21 days. In all experiments, $n = 3$ mice pooled per group and data represent mean of values from 3 independent experiments \pm SEM. **(E)** Autofluorescent analysis of elastin and collagen fibers organisation in the lungs of mice at day-21. Data are representative of three independent experiments. **(F)** Morphological representation of Hematoxylin Phloxin Safran-stained lung sections obtained from mice at day-21. Data are representative of three independent experiments. **(G)** Mean linear intercept measured from Hematoxylin Phloxin Safran-stained lung sections. Data represent mean of values from 3 independent experiments \pm SEM. In all experiments the dose of PPE, VGVAPG or SP instilled to mice was 7.4 μ g, 10 μ g or 10 μ g, respectively. * Significant difference comparing VGVAPG- and PBS-treated mice ($P < 0.05$).

VGVPAG contributes to MMP accumulation in BAL fluid and induces neutrophils to migrate and express MMP. To confirm the role of VGVPAG in airway inflammation and matrix protein degradation during pulmonary emphysema in mouse, we first evaluated the effects of VGVPAG on the expression of MMP-2, MMP-9 and MMP-12 in BAL fluid obtained on days 3, 14 and 21 following peptide instillation. Zymography analysis of the BAL fluids showed a significant increase of the gelatinolytic activities of MMP-2 and MMP-9 after VGVPAG instillation compared to control mice (Figure 2A and 2B). These two gelatinolytic activities gradually increased from the third day, reaching the maximum level on the 21th day. In comparison, the MMP-2 protease activities in BAL fluids from PPE-treated mice were delayed and consistently lower (Figure 2A). Furthermore, the gelatinolytic activity of MMP-9 in BAL fluids of PPE-treated mice did not significantly differ to those observed in control group (Figure 2B). Besides, the western-blot analysis of MMP-12 levels in BAL fluids allowed to demonstrate that MMP-12 expression was increased after instillation of PPE and to establish the role of VGVPAG as a potent inducer of MMP expression (Figure 2C). In keeping with this last observation, we next determined the capacities of neutrophils to migrate and then to express MMP in response to VGVPAG. A Boyden chamber migration system was used to demonstrate that 0.1 µg/ml VGVPAG significantly enhanced the chemotactic activity of neutrophils. We found that this chemotactic response was similar to that observed with the strong chemoattractant RANTES and was totally abolished when neutrophils were pre-incubated with lactose (Figure 2D). In parallel we demonstrated that treatment of neutrophils with 0.1 µg/ml of VGVPAG significantly increased MMP-2 and MMP-9 expression (Figure 2E).

Figure 2

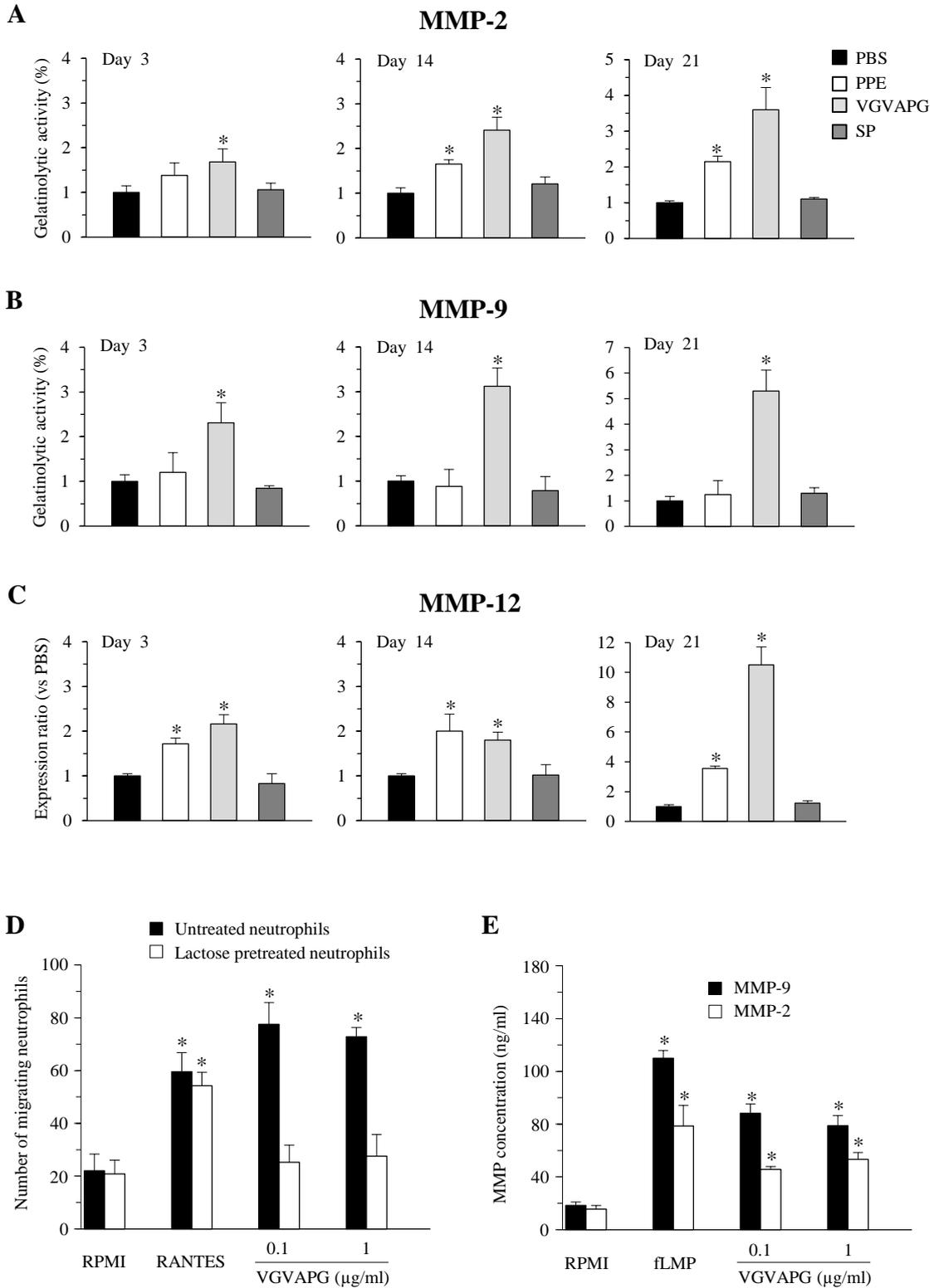


Figure 2. VGVAPG contributes to MMP accumulation in BAL fluid and induces neutrophils to migrate and express MMP. (A to C) MMP-2 (A), MMP-9 (B) and MMP-12 (C) expression in BAL fluids collected at day-3, day-14 and day-21 following instillation of mice with PBS, PPE (7.4 µg), VGVAPG (10 µg) or Scrambled Peptide (SP; 10 µg). In all experiments, n = 3 mice pooled per group and data represent mean of values from 3 independent experiments ± SEM. * Significant difference compared with PBS-treated mice ($P < 0.05$). (D) Murine neutrophils pre-treated or not with lactose were studied for their chemotactic response towards RANTES (0.1 µg/ml; positive control) or VGVAPG. (E) MMP-2 and MMP-9 quantification in the supernatants of murine neutrophils treated with fMLP (100 nM) or VGVAPG. In the last two experiments, data represent mean of values from 3 independent experiments ± SEM. * Significant difference compared with RPMI ($P < 0.05$).

PGAIP is a potential *EBP*-specific antagonist as suggested by molecular dynamic and docking simulations. High propensity of elastin peptides to exhibit a type VIII β -turn on the GXXP sequence has been shown to be the key event for anchoring to the elastin binding protein (EBP) subunit of the elastin receptor complex (26-29). Furthermore, the glycine residue after the GXXP turn was described as necessary for the biological activity of elastin peptides (16). Based on these data, we hypothesized that the active XGXXPG sequences maintaining type VIII β -turns after deletion of the C-terminal glycine residue could act as selective antagonists of EBP-dependent biological activities. To identify elastin peptides with such conformational characteristics, we performed molecular dynamics and docking simulations with the known active VGVAPG and PGAIPG peptides. Molecular dynamic simulations were performed in explicit solvent and lasted for 15 to 25 ns depending on the peptide. The frequency of type VIII β -turns observed with VGVAPG and PGAIPG was at least 28% of time (Figure 3). For VGVAPG, the folding needed several nanoseconds to be effective and lead to a percentage of type VIII β -turns on the last simulation period of 44 %. For PGAIPG, the folding was immediately efficient with a percentage of type VIII β -turns around 50% for the first 7 ns and an average percentage of 29.2% for the overall simulation length. As expected, the inactive GGVPG peptide (36) showed a very low propensity to fold into a β -turn conformation with an overall percentage of 2.7. The loss of the C-terminal glycine residue on VGVAPG was accompanied by a significant decrease of the frequency of type VIII β -turns (VGVAP: 0.9% versus VGVAPG 28.8%). On the contrary, the same deletion on PGAIPG resulted in an increase of type VIII β -turns with an average percentage of 46.2% (versus 29.2 for PGAIPG) up to 61.2% for the last 7 ns. The ability of PGAIP to interact with EBP through a type VIII β -turn structure was reinforced by the molecular docking analysis. Based on AutoDock scoring function that computes the binding energy of each docked conformation and groups conformations into clusters of similar structures, we showed that like for PGAIPG and VGVAPG, the best models obtained for PGAIP were all

corresponding to the first or second cluster of lower energy conformations (Table I). Moreover, the high amount of conformations for the cluster obtained with PGAIP (18 conformations) suggests a high propensity to bind EBP. For GGVPG the docking program struggled to find an optimal interaction structure and the first acceptable binding structure obtained appeared alone at the fifth position.

Figure 3

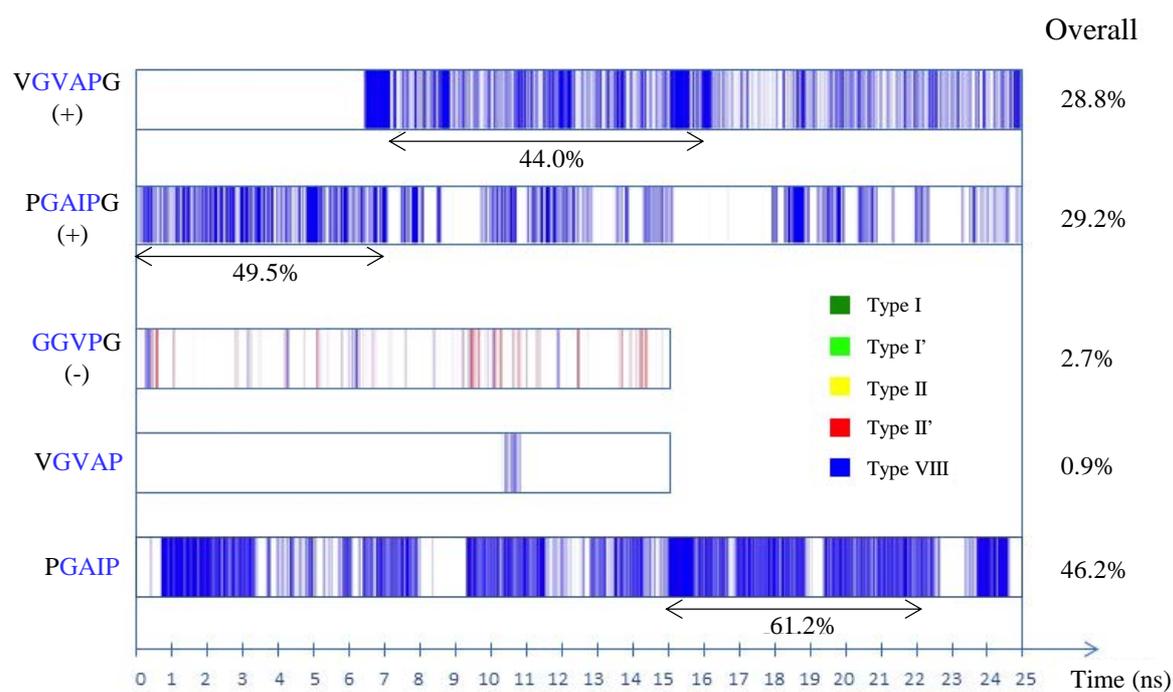


Figure 3. β -turns spanning the GXXP motif as a function of time observed during the molecular dynamics simulations of various elastin peptides. For each peptide, the activity (+) or inactivity (-) observed experimentally was indicated. A vertical colored bar indicates the presence of a β -turn at a given time. For record, β -turns were defined as four consecutive residues for which C_{α} - C_{α} distance between residue i (Gly) and $i + 3$ (Pro) was lower than 7 Å. β -turns were then grouped according to their backbone φ and ψ dihedral angles into seven structural types I, I', II, II', VIa, VIb and VIII (type VIa and VIb β -turns was not here reported as never observed) with an allowed tolerance of $\pm 30^\circ$ for three angles and $\pm 40^\circ$ for the fourth one. The overall type VIII β -turn percentage all along the simulation was reported on the right, whereas a partial percentage for a given subset of simulation was reported below each graph.

Table 1

Characteristics of the best PPE/peptides Molecular Docking Models

Peptide	Activity	Cluster Rank	Cluster Size	C α (Gly) - C α (Pro) Distance (Å)	X ₁ residue		X ₂ residue	
					φ (°)	ψ (°)	φ (°)	ψ (°)
VGVAPG	+	1	4	6.8	-102.7	-25.8	-139.2	121.8
PGAIPG	+	2	6	7.1	-77.6	-44.9	-145.2	124.0
GGVPG	-	5	1	7.6	-153.7	-74.2	-126.5	137.6
VGVAP		1	7	6.6	-89.2	-148.7	-43.4	122.2
PGAIP		2	18	7.3	-89.2	-43.4	-148.7	122.2

For each peptide conformation retained, the specificity of its cluster (rank and size) is indicated. Except for the inactive GGVPG peptide, the best complex structure is obtained for the first or second best energy conformation. Structural characteristics of the GXXP motif are also detailed: the C α (Gly) - C α (Pro) distance and the central residues φ , ψ dihedral angles. According to Hutchinson and Thornton criteria (44), canonical type VIII β -turns are defined by a C α - C α distance $\leq 7\text{Å}$, and $\varphi(X_1) = -60.0^\circ$, $\psi(X_1) = -30.0^\circ$, $\varphi(X_2) = -120.0^\circ$, $\psi(X_2) = 120.0^\circ$ with an allowed tolerance of $\pm 30^\circ$ for three angles and $\pm 40^\circ$ for the fourth one. All the peptides except GGVPG show a canonical type VIII β -turn spanning the GXXP motif with all the criteria fulfilled (a slight deviation is however observed for $\varphi(\text{Val } 3)$ dihedral angle of VGVAPG). For GGVPG, a strong deviation for dihedral angles of Gly 2 is to be noticed.

PGAIPG induces airway inflammation and remodeling whereas PGAIP does not. To confirm the link between the loss of the C-terminal glycine residue on PGAIP and alteration of its biological activities, we endotracheally exposed C57BL/6J mice to a single dose of either PGAIPG (10 µg) or PGAIP (10 µg) and we assessed the hallmark features of emphysema on days 1 to 21. VGVAPG (10 µg) was used as a positive control of lung inflammation and degradation. Exposure of mice to PGAIPG resulted in a similar profile, even if magnitude was lower, of parenchymal inflammation (inflammatory infiltrate in BAL fluid and tissue) (Figure 4A to 4D) and emphysematous destruction (fibers degradation and alveolar enlargement) (Figure 4E to 4G) compared to mice instilled with VGVAPG. In contrast, in mice exposed to PGAIP the number of macrophages and neutrophils in BAL fluids and tissue were not significantly affected compared to control mice (Figure 4A to 4D). Similarly, there were no obvious differences both in the distribution of elastin and collagen fibers and in the size of alveolar spaces between PGAIP-treated mice and the control group exposed to PBS (Figure 4E to 4G).

Figure 4

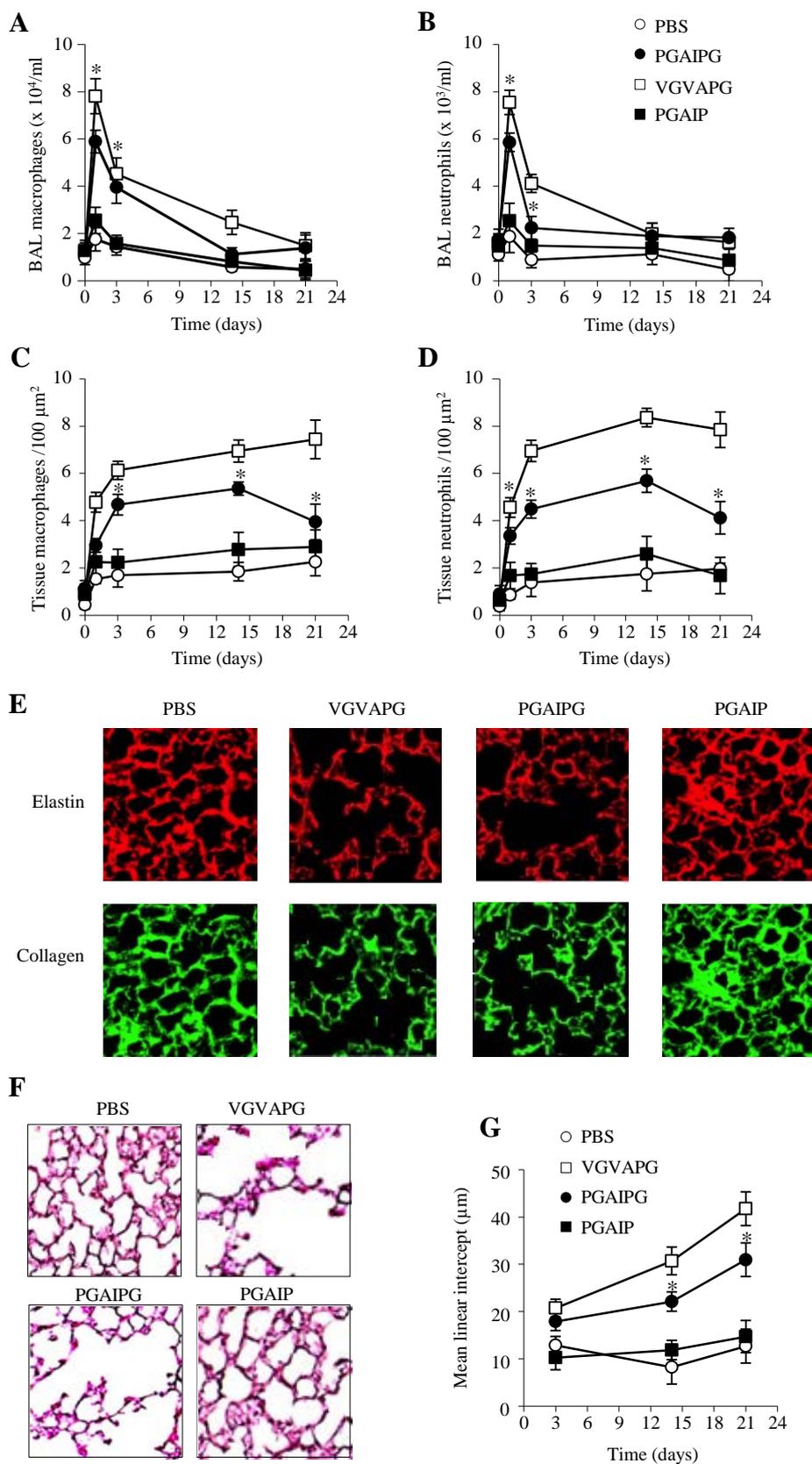
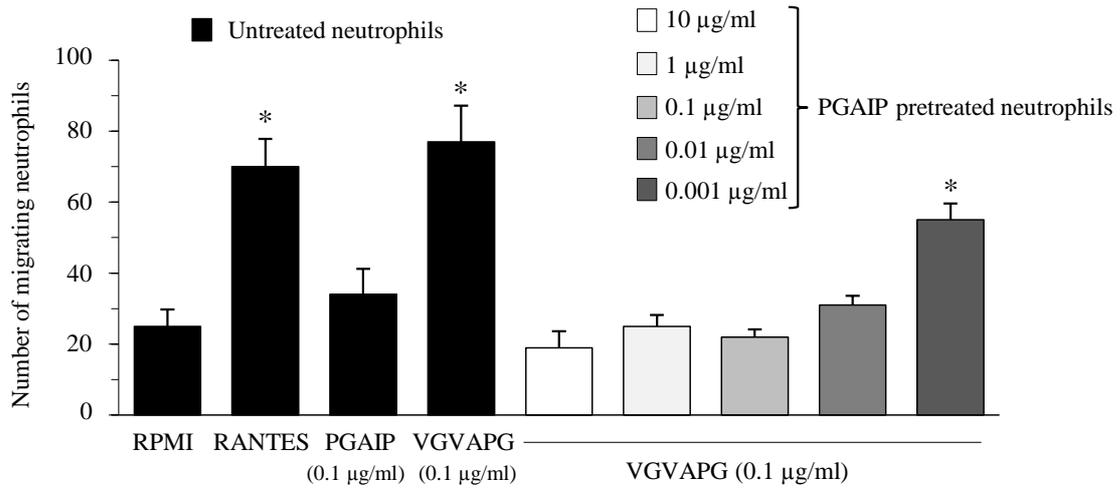


Figure 4. PGAIPG induces airway inflammation and remodeling whereas PGAIP does not. (A to D) Macrophage and neutrophil numbers measured in the BAL fluids (A and B) and in the pulmonary tissue (C and D) of mice exposed to PBS, VGVAPG, PGAIPG or PGAIP for 1 to 21 days. In all experiments, n = 3 mice pooled per group and data represent mean of values from 3 independent experiments \pm SEM. (E) Autofluorescent analysis of elastin and collagen fibers organisation in the lungs of mice at day-21. Data are representative of three independent experiments. (F) Morphological representation of Hematoxylin Phloxin Safran-stained lung sections obtained from mice at day-21. Data are representative of three independent experiments. (G) Mean linear intercept measured from Hematoxylin Phloxin Safran-stained lung sections. Data represent mean of values from 3 independent experiments \pm SEM. In all experiments the dose of VGVAPG, PGAIPG, or PGAIP instilled to mice was 10 μ g for each peptide. * Significant difference comparing PGAIPG- and PBS-treated mice ($P < 0.05$).

PGAIP counteracts VGVAPG-induced neutrophil migration in vitro. We postulated that the key mechanism by which VGVAPG trigger lung inflammation and degradation in mice is by increasing the recruitment of neutrophils to the lungs. Given both this consideration and our results above described, we hypothesized that PGAIP could regulate this key event by counteracting VGVAPG-induced neutrophil migration. To evaluate this hypothesis *in vitro*, we first pre-treated neutrophils with different concentrations of PGAIP (0.001 to 10 $\mu\text{g/ml}$) before chemotaxis assay towards VGVAPG (0.1 $\mu\text{g/ml}$) using a Boyden chamber migration system. Results showed that while VGVAPG induced a significant migration of untreated neutrophils, a one-hour pre-incubation of neutrophils with PGAIP concentrations ranging from 0.01 to 10 $\mu\text{g/ml}$ significantly inhibited the VGVAPG-dependent chemotaxis of these cells (Figure 5A). This inhibitory effect was not reproduced when PGAIP was used at the lower concentration (0.001 $\mu\text{g/ml}$). Of note, no PGAIP-dependent chemotaxis of untreated neutrophils was observed in our experimental conditions. To provide further evidence for the capacity of PGAIP to limit neutrophil migration towards VGVAPG, PGAIP (0.001 to 10 $\mu\text{g/ml}$) and VGVAPG (0.1 $\mu\text{g/ml}$) were co-incubated in various ratios and the effects of the mixture on neutrophil migration was studied. Analysis of neutrophil chemotaxis towards these peptide combinations showed that PGAIP inhibits the effects of VGVAPG on neutrophil migration in a dose-dependent manner (Figure 5B).

Figure 5

A



B

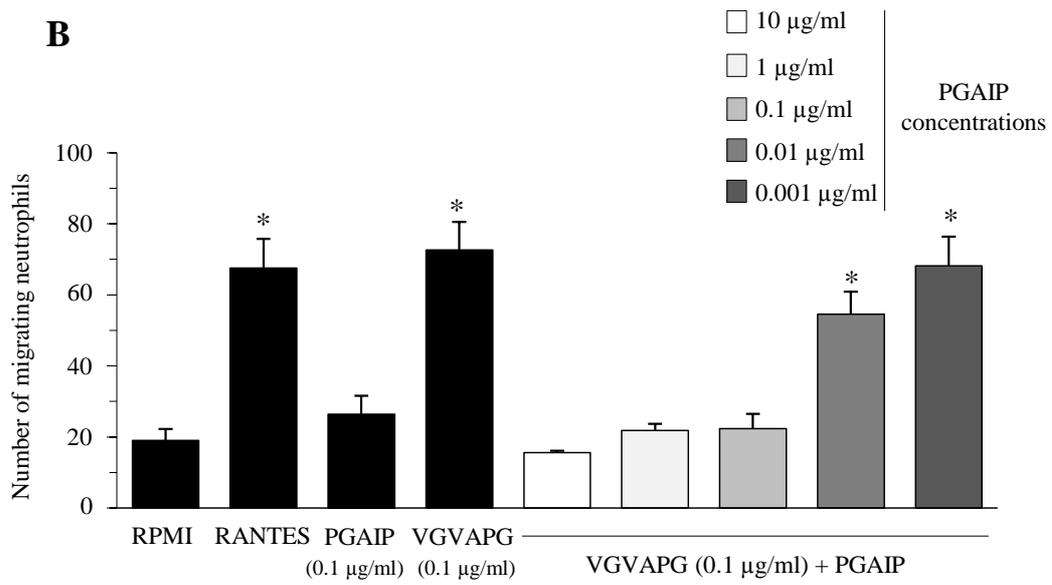


Figure 5. PGAIP counteracts VGVAPG-induced neutrophil migration in vitro. **(A)** Murine neutrophils pre-treated or not with various concentrations of PGAIP (10 to 0.001 $\mu\text{g/ml}$ during 1 h) were studied for their chemotactic response towards RANTES (0.1 $\mu\text{g/ml}$; positive control), PGAIP (0.1 $\mu\text{g/ml}$) or VGVAPG (0.1 $\mu\text{g/ml}$). **(B)** Murine neutrophils were studied for their chemotactic response towards RANTES (0.1 $\mu\text{g/ml}$; positive control), PGAIP (0.1 $\mu\text{g/ml}$), VGVAPG (0.1 $\mu\text{g/ml}$) or various concentration ratios of VGVAPG (0.1 $\mu\text{g/ml}$) and PGAIP (10 to 0.001 $\mu\text{g/ml}$). In all experiments, data represent mean of values from 3 independent experiments \pm SEM. * Significant difference compared with RPMI ($P < 0.05$).

PGAIP partially protects mice from VGVAPG-dependent pulmonary emphysema. We next evaluated whether PGAIP could antagonize VGVAPG effects *in vivo* by exposing mice to a single instillation of a peptide combination containing 10 µg of both VGVAPG and PGAIP. On day 21, the mice were euthanized, inflammation was evaluated by inflammatory cell counting in tissue and protease analysis in BAL fluids, and parenchyma degradation was investigated by analyzing both the elastin and collagen fiber distribution and the size of alveolar spaces. Results showed that in the presence of PGAIP the effects of VGVAPG on inflammatory cell migration in lung tissue (Figure 6A and 6B) and on MMP-2, -9 and -12 expressions in BAL fluids (Figure 6C to 6E) were highly reduced. However, PGAIP did not fully prevent VGVAPG effects since significant levels of neutrophils and of MMP-2 were found on day 21 in the tissue and in the BAL fluids, respectively. This persistence did not occur neither for macrophages in lung tissue nor for MMP-9 and MMP-12 in BAL fluids. VGVAPG-dependent breakdown of elastin and collagen fibers and airway remodeling were also significantly abrogated when PGAIP was present in the peptide solution instilled to mice (Figures 6F and 6G). Nonetheless, a moderate degree of airspace enlargement was always observed as evidenced by the mean linear intercept values (Figure 6H).

Figure 6

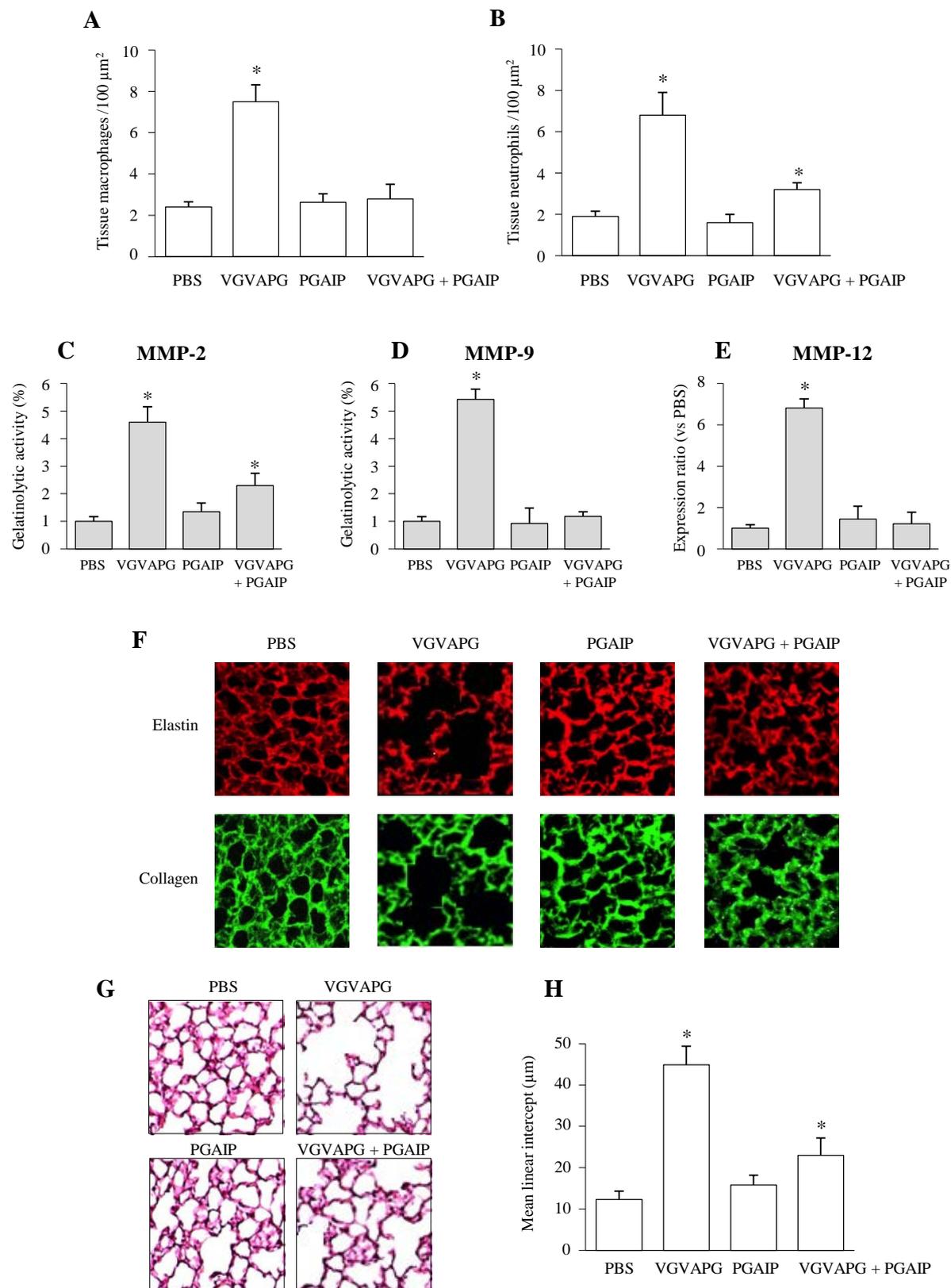


Figure 6. PGAIP partially protects mice from VGVAPG-dependent pulmonary emphysema. (A and B) Macrophage and neutrophil numbers measured in the pulmonary tissue of mice exposed to PBS, VGVAPG, PGAIP or the combination PGAIP/VGVAPG during 21 days. In all experiments, n = 3 mice pooled per group and data represent mean of values from 3 independent experiments \pm SEM. (C to E) MMP-2 (C), MMP-9 (D) and MMP-12 (E) expression in BAL fluids collected at day-21 following instillation of mice with PBS, VGVAPG or PGAIP or the combination PGAIP/VGVAPG. In all experiments, n = 3 mice pooled per group and data represent mean of values from 3 independent experiments \pm SEM. * Significant difference compared with PBS-treated mice ($P < 0.05$). (F) Autofluorescent analysis of elastin and collagen fibers organisation in the lungs of mice at day-21. Data are representative of three independent experiments. (G) Morphological representation of Hematoxylin Phloxin Safran-stained lung sections obtained from mice at day-21. Data are representative of three independent experiments. (H) Mean linear intercept measured from Hematoxylin Phloxin Safran-stained lung sections. Data represent mean of values from 3 independent experiments \pm SEM. In all experiments the dose of VGVAPG or PGAIP instilled to mice was 10 μ g for each peptide. * Significant difference compare with PBS-treated mice ($P < 0.05$).

Discussion

COPD is a major respiratory health problem worldwide identified by chronic airway inflammation and pulmonary emphysema. Emphysema is characterized by airspace enlargement and alveolar extracellular matrix destruction (2). Studies in humans with severe α -1 anti-trypsin deficiency (37, 38) and in animal models exposed to proteases (31-33) indicate that emphysema partly results from proteolytic breakdown of extracellular matrix proteins by enzymes released from lung infiltrated inflammatory cells. Elastin peptides which are highly produced during pulmonary elastin degradation (8-10) are known to share miscellaneous biological activities, predominantly chemotactic activities and protease release (11, 16). Here, we report that elastin peptides are potent inducers contributing to hallmark features of emphysema in mice whose deleterious effects on lungs can be resolved by analog peptides acting as competitive antagonists.

The first aim of this study was to characterize the effects of the administration of elastin peptides, i.e. VGVAPG, on the induction of pro-inflammatory response and emphysema in mice. We found a positive correlation among lung inflammatory response, airspace enlargement, parenchyma tissue degradation, and instillation of a single endotracheal dose of VGVAPG. VGVAPG-treated mice experienced similar inflammatory process and emphysematous structural changes to those observed following endotracheal administration of PPE described as a pulmonary inflammatory model whose traits closely resemble to human emphysema (30-33). Previous report has shown that neutrophil-derived MMPs-2 and -9 were involved in the progression of PPE induced-pulmonary emphysema in the initial phase, whereas macrophage-derived proteases would be responsible for further destruction of the lungs in a later phase (39). Here we report that MMPs are poorly present in BAL fluids before 3-days exposure of mice to PPE. This leads us to assume that elastolytic activity of PPE itself is presumably responsible for the progression of pulmonary emphysema in the early phases of

inflammation. In contrast, MMPs-2 and -12, but not MMP-9, are significantly produced in BAL Fluids at days 14 and 21. According to these data, MMP-2 and MMP-12 have been described to be key proteases in mouse models of pulmonary emphysema, including PPE models (40-43). In our model of VGVAPG-induced emphysema we demonstrated that both acute (between days 0 and 3) and chronic (after day 7) pulmonary inflammation was dominated by neutrophil and macrophage recruitment as well as MMPs-2, -9 and -12 secretions in BAL fluid. Interestingly, we also demonstrated an increase of neutrophil migration and of MMP-2 and -9 productions by these cells in response to VGVAPG activation *in vitro*. Effects of VGVAPG were mediated via the elastin receptor, as lactose, the natural elastin receptor agonist, blocked VGVAPG-related changes. Our data corroborate those of previous studies demonstrating that *i*) neutrophils are rapidly recruited from the circulation during pulmonary inflammation (44), *ii*) elastin-derived peptides activate proteases release (16, 17) and exert potent chemotactic activities towards monocytes and neutrophils (12, 24, 45), and *iii*) elastin peptides antagonism abrogates both cigarette smoke-induced monocyte recruitment to the lung and PPE-induced emphysema *in vivo* (33). Previous report has already shown that intra-tracheal administration of VGVAPG results in an important increase in lung macrophage content (33). However, our study is the first to propose a global kinetic analysis of elastin peptide-induced emphysema in mice in order to examine and correlate lung inflammation and parenchyma destruction simultaneously.

A rationale can be proposed to explain the relationship between inflammatory process installation and elastin peptide administration in our model. When VGVAPG is endotracheally instilled and reaches the airways, inflammatory cells are rapidly chemo-attracted to migrate to the alveolar spaces. In addition, inflammatory cells infiltrating pulmonary tissue are activated by VGVAPG and then release proteases that contribute to parenchyma destruction, including degradation of elastin fibers. The increase of elastinolytic activity accompanying increase in the MMP-2 levels in the lungs was associated with

pulmonary emphysema development (46). Thus, elastin breakdown leads to the genesis of elastin peptides that participate to a self-perpetuating process involved in the establishment of pulmonary emphysema. Importantly, the fact that mice exposed to a single dose of the elastin peptide PGAIPG also underwent typical emphysematous tissue destruction strongly suggests that different peptides issue from elastin degradation can interact with the EBP subunit on the elastin receptor complex for triggering signals responsible for pulmonary deleterious effects. This latter finding let us consider EBP as a common denominator in elastin peptide-induced emphysema development in mice and consequently let us focus on elastin peptide/EBP interactions to propose pharmacological approach to circumscribe elastin peptide effects *in vivo*.

Another aim of this study was to identify analog peptides exhibiting conformation that allows binding to EBP without triggering signaling cascade. VGVAPG and PGAIPG both contain a GXXPG sequence and exhibit a type VIII β -turn on the GXXP motif for anchoring to EBP (26-29) and display biological activities (12, 24). Brassart *et al.* 2001, implicated the C-terminal glycine residue after the GXXP turn in the biological activity of elastin peptides (16). In keeping with these data, we performed molecular modeling studies from VGVAPG and PGAIPG and we evidenced that PGAIP shows a very high propensity to fold into a type VIII β -turn and to bind EBP. In addition, unlike PGAIPG, we showed that an intra-tracheal administration of PGAIP to WT mice did not induced inflammatory response or alteration of lung tissue integrity. In keeping with these data, no MMPs expression was detected in the BAL fluids of PGAIP-treated mice (data not shown). Regarding VGVAP and the well-known inactive GGVPG elastin peptide (36), there was a low presence of type VIII β -turn, probably reflecting structures with a high flexibility. Considering our results and those of others, there seems to be a crucial relationship among the presence or not of a glycine residue in the C-terminal position and the capacity of elastin peptides with a conformation close to a type VIII

β -turn to display or not biological functions. Our discovery that PGAIP abolished the *in vitro* effects of VGVAPG on neutrophil migration in a dose-dependent manner has raised the possibility that this peptide could display comparable effects *in vivo*. A single dose of PGAIP instilled in mouse lungs at the time of VGVAPG exposure partially protects animals from VGVAPG-dependent emphysema. The observations not consistent with a total efficiency of PGAIP to abrogate VGVAPG effects on lungs were a low but significant infiltrate of neutrophils in the pulmonary tissue associated with MMP-2 expression in BAL fluids and a significant increase of the size in alveolar spaces. We could not deny the possibility that PGAIP itself participates in some of these biological effects. However, we feel that this is less likely, given the lack of effects observed on lung neutrophil migration, on MMP-2 expression in BAL fluids and on pulmonary tissue integrity in mice exposed to PGAIP alone. Competition among two chemical molecules is a very dynamic event depending on various parameters such as affinity, avidity and the dose ratio used. The dose of PGAIP selected in our study is in agreement both with the data we obtained demonstrating the efficiency of a one to one ratio to inhibit VGVAPG effects *in vitro* and with the critical dose of VGVAPG required to elicit expected effects on lungs *in vivo*. Moreover, we obtained similar results using 2 to 5-fold increased PGAIP doses whereas the dose of VGVAPG was maintained constant (data not shown). Taken together our results demonstrate that PGAIP is a partial antagonist of elastin peptides effects belonging to a new class of therapeutic compounds useful to reduce emphysema. Many other analog peptides should be examined in future to identify the best candidate for antagonize elastin peptide deleterious effects.

In summary, the present study has shown *i)* that elastin peptides are key actors in the development of emphysema, and pharmacological targets that are to be considered to propose alternative treatment of emphysema, *ii)* that molecular modeling studies are original

approaches to screen analog peptides susceptible to antagonize the elastin peptide/EBP interactions, and *iii*) that our short-term mouse model can be used to evaluate and validate the analog peptide effects on the resolution of pulmonary emphysema *in vivo*.

Methods

Animals. Six-week old C57BL/6J female mice were purchased from Harlan Sprague Dawley. Mice were housed in an animal facility that was maintained at 22-26°C with 40-69% humidity and a 12-h light/dark cycle. Animals were fed with a commercial diet and received water *ad libitum*. Animals were humanely cared for, and all animal experiments were approved by the Committee for Animal Research at University of Reims Champagne Ardenne.

Animal procedure. Mice were anesthetized intraperitoneally using ketamine (50 mg/kg) and xylazine (5 mg/kg). After appropriately sedation, mouse lungs were endotracheally (e.t.) instilled with either PBS, one unit (7.4 µg) PPE (Sigma), 10 µg VGVAPG (Genepep), 10 µg VVGPGA (scrambled peptide, Genepep), 10 µg PGAIPG (Genepep) or 10 µg PGAIP (Genepep) via a 22-gauge i.v. catheter in a total volume of 50 µl PBS. PPE was chosen as a positive inducer in this study because previous data have shown that it induced pulmonary emphysema in mice (31, 47). Animals were sacrificed by CO₂ inhalation on days 1, 3, 7, 14 and 21. In some experiments, we co-administered PGAIP to VGVAPG-recipient mice to evaluate the capacity of PGAIP to neutralize the VGVAPG-induced pulmonary damage. In these experiments, animals received a single mixture of VGVAPG (10 µg) and PGAIP (100 µg) at time 0 and were sacrificed on the 21st day. In these different approaches, bronchoalveolar lavage (BAL) fluids were recovered to analyze cell profiles and to determine MMP activities. After BAL fluid collection, the lungs were inflated, removed and either embedded in paraffin to allow histological and morphological analysis or frozen to analyze cell infiltration in parenchyma.

Bronchoalveolar lavage. The trachea was inserted with a 22-gauge i.v. catheter, and the whole lungs were washed three times with 1 ml PBS. Bronchoalveolar lavage (BAL) fluid was centrifuged at 900 g for 10 min at +4°C, and the supernatant was collected and stored at -

80°C until required. Cell pellet was resuspended in 1 ml of PBS, and cell count was performed. Cell viability was more than 95% as determined by trypan blue exclusion. Aliquots of cells were then stained with fluorescent mAb specific for neutrophil (Ly-6G, BD Biosciences), macrophage (Mac-3, BD Biosciences) or T lymphocyte surface antigens (CD3, BD P Biosciences). Flow cytometry analysis was performed and absolute number in cell populations was calculated.

Flow cytometry analysis. Isolated BAL fluid cells were incubated with either 1 µg/ml FITC-conjugated anti-mouse Mac-3 (clone M3/84), 1 µg/ml PE-conjugated anti-mouse Ly-6G (clone 1A8), and 1 µg/ml Pacific blue-conjugated anti-mouse CD3 (clone 500A2) mAb at room temperature for 20 min in the dark to prevent fluorescence quenching. Then, cells were washed twice (400 g, 10 min) and resuspended in 500 µl PBS containing 1% PFA. In parallel, isotype-matched controls were used to determine nonspecific labelling. Fluorescence emission was assessed by flow cytometric analysis using an LSRFortessa cell analyzer (BD Biosciences).

Lung tissue preparation. The lungs were inflated for 10 min at a constant pressure of 25 cm H₂O in the presence of either 10% neutral buffered formalin solution (Sigma) or PBS and then removed. Formalin inflated lungs were fixed in 4% PFA for 24 h at room temperature before embedding in paraffin. Then, transverse 3-µm or 20-µm sections of lung were cut for morphological or collagen and elastin network analysis, respectively. PBS inflated lungs were frozen in liquid nitrogen to analyze cell infiltration by immunofluorescent staining from cryosections.

Morphological analysis. Serial mid-sagittal sections (3-µm thick) stained with Hematoxylin Phloxin Safran were used for morphological analysis. Ten randomly selected (x400) fields per slide were photographed using Zen (Zeiss). The images were analyzed using Image J (open

source). From each field five areas of interest, free of airways and muscular blood vessels, were picked for measurement of the number of intersections of virtual lines of known length, with alveolar septa. An increase in the average distance between intercepts (mean Linear intercept) indicates enlarged airspaces.

Collagen and elastin network analysis. Serial unstained mid-sagittal sections (20- μ m thick) were used for the simultaneous visualization of collagen (SHG) and elastin (2PEF) in lung tissue section based on the combination of second-harmonic generation (SHG) and two photons excited fluorescence (2PEF) signals generated by a fiber-optic confocal autofluorescence microscope. We used a laser scanning microscope LSM 710 NLO (Zeiss) managed by ZEN. Excitation was provided by a CHAMELEON femtosecond Titanium-Sapphire laser (Coherent) set at 860 nm with 20% power. Samples were imaged with a 20x, 0.8 NA objective lens. The emitted SHG and 2PEF signals generated from the sample were collected in backward direction with two separate detectors using a bandpass filter 420-440 nm and a bandpass filter 450-751 nm, respectively.

Immunofluorescent staining. Lung-infiltrating macrophages and neutrophils were stained for 1 h at room temperature with rat anti-mouse macrophage marker (clone ER-MP58, Santa Cruz Biotechnology) and rat anti-mouse LY-6G (clone M-66, Santa Cruz Biotechnology) primary antibodies, respectively. Slices were then rinsed twice with PBS and incubated with biotin-conjugated goat anti-rat secondary antibodies (Jackson Immuno-Research Laboratories). One hour after incubation at room temperature, slices were rinsed again before incubation with Alexa Fluor 488-conjugated streptavidin (1:100 dilution; Molecular Probes). Nuclei were stained with Hoescht and lung sections were counterstained with Harris hematoxylin and mounted with antifading solution (Biovaley) onto glass slides. Slices were observed with an Axiophot fluorescence microscope (Zeiss) and counted from 10 different high-powered x40 fields per slide.

Neutrophil chemotaxis assay. Neutrophil chemotactic activity was determined using a Boyden chamber method. Briefly, 27 μl of RANTES (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), VGVAPG (0.1 and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or PGAIP (0.1, 1 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were added to the lower wells of a 48-well Boyden chamber (Neuro Probe) and covered with a 5 μm polycarbonate filter (VWR International). 50 μl of neutrophil suspension (5×10^5 cells/mL) were then added to the upper wells of the chamber and incubated for 45 min at 37°C in 5% CO_2 . Migrating cells, fixed and stained with eosin and bromophenol blue at the lower part of the filter, were counted by microscopy in five randomly selected high-power (400 x) fields per well. In some experiments, pre-treatment of neutrophils for 1 h with 10 mM lactose (Sigma-Aldrich), a galactosugar known to induce S-Gal shedding from cell surface (23), was used to assess the specificity of VGVAPG effects. In some others, various concentrations of PGAIP (10 to 0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were used either for pre-treatment of neutrophils 1 h before chemotaxis assay towards VGVAPG (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or for co-incubation with VGVAPG (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) during neutrophil chemotaxis assay. All experiments were performed in triplicate and results are reported as the mean number of cells per field.

Zymography. The gelatinolytic activity of MMP-2 and MMP-9 were measured by gelatin zymography as described previously (48). BAL Fluids (10 μl) were eluted in non-reducing sample buffer (Biorad) and subjected to electrophoresis in 10% SDS-polyacrylamide gels containing 1 mg/ml of gelatin as substrate. Following electrophoresis, the gels were washed twice in 2.5% Triton X-100 for 1 h at room temperature and further incubated at 37°C overnight in 50 mM Tris-HCl containing 5 mM CaCl_2 and 200 mM NaCl (pH 7.6). Proteolytic activity was visualized by staining the gels with 0.1% Coomassie blue containing 30% Propanol-2 and 10% acetic acid, followed by destaining in 7.5% acetic acid and methanol. MMPs gelatinolytic activities were evidenced as white zones of lysis. Gelatinase

activities were quantified by an automated image analyzer (Vuilber-Lourmat). Linear range of enzyme activity was assessed using recombinant MMP-2 and MMP-9 as standard.

Molecular dynamic (MD) simulations. All the MD simulations were performed using the c37b1 version of the CHARMM program (49, 50), with the potential function parameter set 22 (51). They were performed at 300 K using the Verlet algorithm with an integration time step of 2 fs, as bonds involving hydrogen atoms were constrained using the SHAKE algorithm (52). All atoms were explicitly included in the calculation. The peptide was embedded in a 40 Å equilibrated TIP3P water box with a dielectric constant set to 1.0 and periodic boundary conditions were applied. The chosen starting structure for each peptide was a fully extended conformation (i.e., dihedral angles $\varphi, \psi = 180^\circ$, except for proline, for which $\varphi = -76.1^\circ$ and $\psi = 180^\circ$) in a zwitterionic form. This starting structure was chosen in order not to influence the peptide folding. For the non-bonded terms, we used a protocol that has been shown to be efficient and accurate in cutoff-based simulations using a force switching function for electrostatics and a potential shifting function for van der Waals interactions, both applied between 10 and 12 Å (53). The system was subjected to two cycles of energy minimization in each of which two series of 100 steps of Steepest Descent (SD) and 500 steps of Adapted-Basis Newton Raphson (ABNR) were performed, first with the fixed peptide and then with the fixed solvent. A final minimization, with all constraints removed, was performed in the full conformational space. The system was heated to 300 K in 100 picoseconds (ps) and then equilibrated in two 100-ps stages; in the early equilibration, velocities were assigned using a Gaussian distribution and in the late equilibration, the velocities were scaled every 50 steps to keep the temperature at 300 K ± 10 K. The production stage lasted 15 or 25 ns for each peptide. The MD simulations were systematically analyzed in terms of β -turn (54) spanning the GXXP motif. β -turns are defined as secondary structures in which four consecutive amino acid residues ($i, i + 1, i + 2, i + 3$) fold the polypeptide chain back upon

itself by nearly 180°, with a $C_{\alpha}(i) - C_{\alpha}(i + 3)$ distance lower than 7 Å. Several β -turn types have been characterized and grouped into seven structural groups (I, I', II, II', VIa, VIb, and VIII), according to the backbone φ , ψ dihedral angle values of their two central residues ($i + 1$ and $i + 2$). From our MD trajectories, we extracted the $C_{\alpha}(i) - C_{\alpha}(i + 3)$ distance and the central residues φ , ψ dihedral angles. A β -turn type was detected when its conformation followed the exact criteria given by Hutchinson and Thornton (44): a $C_{\alpha}(i) - C_{\alpha}(i + 3)$ distance ≤ 7 Å together with an allowed tolerance for the central residue dihedral angles of $\pm 30^\circ$ for three of them and $\pm 40^\circ$ for the fourth one. β -Turns, whose $C_{\alpha}(i) - C_{\alpha}(i + 3)$ distance fulfills the criterion but that cannot be classified in any structural type, according to their dihedral angle values, are grouped in class IV. Usually this category regroups distorted turns common in proteins. The studied peptides contain a short number of residues and therefore show a high flexibility. For this reason, many type IV β -turns have been detected during all the MD simulations and it seemed interesting to determine the nearest canonical β -turn type for each of them. For this purpose, a Euclidean distance D , in four dimensional spaces, between the current turn and any one of the reference turns, was calculated as follows:

$$D = \sqrt{\Delta_{\varphi(i+1)}^2 + \Delta_{\psi(i+1)}^2 + \Delta_{\varphi(i+2)}^2 + \Delta_{\psi(i+1)}^2}$$

where, for instance, $\Delta_{\varphi(i+1)} = \varphi(i + 1)_{observed} - \varphi(i + 1)_{canonical}$

With this criterion, β -turns belonging to type IV can be assigned to another particular class for which D is minimum.

Molecular docking. The molecular docking computations attempt to predict the structure of a complex formed between a small flexible molecule (ligand) and its target says a protein. Numerous positions and conformations of the ligand at the surface of the protein are generated using a stochastic search method (here we used the hybrid global local search

Lamarckian Genetic Algorithm (LGA)) and the resulting binding modes are evaluated by the docking program through the choice of a scoring function. Our docking computations have been carried out with several elastin derived peptides (as ligand) using Porcine Pancreatic Elastase (PPE) as target protein. AutoDock 3.5 program (55) was used to perform the computational molecular docking as more recent versions (4.0 and 4.2) of this program failed to predict complex structure of PPE with its peptide inhibitor (code pdb 1GVK). Each docking experiment was carried out in the vicinity of the N-terminal part of PPE, the sequence having a strong homology with the S-gal peptide of Elastin Binding Protein (EBP) and supposed to be a common active site (56). Grid maps were centered on N-terminal part of PPE, with $126 \times 126 \times 126$ grid points and a spacing of 0.21 Å between the grid points. For each ligand, four cycles constituted of a series of 250 runs were performed with an initial population of 50 individuals, a maximum number of 500,000 energy evaluations and a maximum number of 17,000,000 generations. The default parameters for the LGA and Solis and Wet local search were used. Docked conformations of the ligands were clustered with a root mean square deviation (RMSD) cut-off of 1 Å. AutoDockTools (ADT) package was employed to prepare the input files necessary to the docking procedures and to analyze the docking results. The molecular graphics of the three-dimensional structures and their display have been done using PyMOL program (www.pymol.org).

Statistical analysis. Data are presented as means \pm SEM. Difference among groups was analyzed by ANOVA followed by Bonferroni's comparison. For all analyses, a *P* value < 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed using StatView software.

References

1. World Health Organization. Global burden of disease: 2004 update. Geneva: World Health Organization; 2008.
2. Global strategy for diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease, Global initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) 2010. www.Goldcopd.org. Date last updated: December 2010. Date last accessed: august 2011.
3. Owen CA. Proteinases and oxidants as targets in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(4):373–385.
4. C.A. Owen. Roles for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Int. J. Chron Obstruct Pul. Dis*. 2008;3(2):253–268.
5. Vrhovski B, Weiss AS. Biochemistry of tropoelastin. *Eur J Biochem*. 1998;258(1):1–18
6. Lombard C, Arzel L, Bouchu D, Wallach J, Saulnier J. Human leukocyte elastase hydrolysis of peptides derived from human elastin exon 24. *Biochimie* 2006;88(12):1915–1921.
7. Gottlieb DJ, Stone PJ, Sparrow D, *et al*. Urinary desmosine excretion in smokers with and without rapid decline of lung function: the Normative Aging Study. *Am J Respir Crit Care Med*. 1996;154(5):1290–1295.
8. Schriver EE, Davidson JM, Sutcliffe MC, Swindell BB, Bernard GR. Comparison of elastin peptide concentrations in body fluids from healthy volunteers, smokers, and patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis*. 1992;145(4):762–766.

9. Betsuyaku T, Nishimura M, Yoshioka A, Takeyabu K, Miyamoto K, Kawakami Y. Elastin-derived peptides and neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;154(3):720–724.
10. Dupont A, Dury S, Gafa V, *et al.* Impairment of neutrophil reactivity to elastin peptides in COPD. *Thorax* 2013;68(5):421–428.
11. Senior RM, Griffin GL, Mecham RP. Chemotactic responses of fibroblasts to tropoelastin and elastin-derived peptides. *J Clin Invest.* 1982;70(3):614–618.
12. Senior RM, Griffin GL, Mecham RP, Wrenn DS, Prasad KU, Urry DW. Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a Repeating Peptide in Elastin, is Chemotactic for fibroblasts and Monocytes. *J Cell Biol.* 1984;99(3):870–874.
13. Ghuysen-Itard AF, Robert L, Jacob MP. Effect of elastin peptides on cell proliferation. *C R Acad Sci III* 1992;315(12):473–478.
14. Baranek T, Debret R, Antonicelli F, *et al.* Elastin receptor (spliced galactosidase) occupancy by elastin peptides counteracts pro-inflammatory cytokine expression in lipopolysaccharide-stimulated human monocytes through NF-kappaB down-regulation. *J Immunol.* 2007;179(9):6184–6192.
15. Debret R, Le Naour R, Sallenave JM, *et al.* Elastin fragments induce IL-1beta upregulation via NF-kappaB pathway in melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 2006;126(8):1860–1868.
16. Brassart B, Fuchs P, Huet E, *et al.* Conformational dependence of collagenase (matrix metalloproteinase-1) up-regulation by elastin peptides in cultured fibroblasts. *J Biol Chem.* 2001;276(7):5222–5227.

17. Toupance S, Brassart B, Rabenoelina F, et al. Elastin-derived peptides increase invasive capacities of lung cancer cells by post-transcriptional regulation of MMP-2 and uPA. *Clin Exp Metastasis* 2012;29(5):511–522.
18. Sandberg LB, Soskel NT, Leslie JG. Elastin structure, biosynthesis, and relation to disease states. *N Engl J Med.* 1981;304(10):566–579.
19. Grosso LE, Scott M. Peptide sequences selected by BA4, a tropoelastin-specific monoclonal antibody, are ligands for the 67-kilodalton bovine elastin receptor. *Biochemistry* 1993;32(48):13369–13374
20. Hinek A, Rabinovitch M, Keeley F, Okamura-Oho Y, Callahan J. The 67-kD elastin/laminin-binding protein is related to an enzymatically inactive, alternatively spliced form of beta-galactosidase. *J Clin Invest.* 1993;91(3):1198–1205.
21. Hinek A. Nature and the multiple functions of the 67-kD elastin-/laminin binding protein. *Cell Adhes Commun* 1994;2(3):185–193.
22. Privitera S, Prody CA, Callahan JW, Hinek A. The 67-kDa enzymatically inactive alternatively spliced variant of beta-galactosidase is identical to the elastin/laminin-binding protein. *J Biol Chem.* 1998;273(11):6319–6326.
23. Mecham RP, Whitehouse L, Hay M, Hinek A, Sheetz MP. Ligand affinity of the 67-kD elastin/laminin binding protein is modulated by the protein's lectin domain: visualization of elastin/laminin-receptor complexes with gold-tagged ligands. *J Cell Biol.* 1991;113(1):187–194.
24. Grosso LE, Scott M. PGAIPG, a repeated hexapeptide of bovine and human tropoelastin, is chemotactic for neutrophils and Lewis lung carcinoma cells. *Arch Biochem Biophys.* 1993;305(2):401–404.

25. Bisaccia F, Morelli MA, De Biasi M, Traniello S, Spisani S, Tamburro AM. Migration of monocytes in the presence of elastolytic fragments of elastin and in synthetic derivatives. Structure-activity relationships. *Int J Pept Protein Res.* 1994;44(4):332–341.
26. Floquet N, Héry-Huynh S, Dauchez M, Derreumaux P, Tamburro AM, Alix AJ. Structural characterization of VGVAPG, an elastin-derived peptide. *Biopolymers* 2004;76(3):266–280.
27. Fuchs PF, Alix AJ. High accuracy prediction of beta-turns and their types using propensities and multiple alignments. *Proteins* 2005;59(4):828–839.
28. Moroy G, Alix AJ, Héry-Huynh S. Structural characterization of human elastin derived peptides containing the GXXP sequence. *Biopolymers* 2005;78(4):206–720.
29. Moroy G, Ostuni A, Pepe A, Tamburro AM, Alix AJ, Héry-Huynh S. A proposed interaction mechanism between elastin-derived peptides and the elastin/laminin receptor-binding domain. *Proteins* 2009;76(2):461–476.
30. Snider GL, Lucey EC, Stone PJ. Animal models of emphysema. *Am Rev Respir Dis.* 1985;133(1):149–169
31. Lucey EC, Keane J, Kuang PP, Snider GL, Goldstein RH. Severity of elastase-induced emphysema is decreased in tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta receptor-deficient mice. *Lab Invest.* 2002;82(1):79–85.
32. Rubio ML, Martin-Mosquero MC, Ortega M, Peces-Barba G, González-Mangado N. Oral N-acetylcysteine attenuates elastase-induced pulmonary emphysema in rats. *Chest* 2004;125(4):1500–1506.
33. Houghton AM, Quintero PA, Perkins DL, *et al.* Elastin fragments drive disease progression in a murine model of emphysema. *J Clin Invest.* 2006;116(3):753–759.

34. Kuhn C 3rd, Engleman W, Chraplyvy M, Starcher BC. Degradation of elastin in experimental elastase-induced emphysema measured by a radioimmunoassay for desmosine. *Exp Lung Res.* 1983;5(2):115–123.
35. Kuhn C, Yu SY, Chraplyvy M, Linder HE, Senior RM. The induction of emphysema with elastase: changes in connective tissue. *Lab Invest.* 1976;34(4):372–380.
36. Castiglione Morelli MA, Bisaccia F, Spisani S, De Biasi M, Traniello S, Tamburro AM. Structure-activity relationships for some elastin-derived peptide chemoattractants. *J Pept Res.* 1997;49(6):492–499.
37. Laurell C, Ericksson S. The electrophoretic alpha-1-globulin pattern of serum in alpha-1-antitrypsin deficiency. *Scand J Clin Lab Invest.* 1963;15(2):132–140.
38. Jones DK, Godden D, Cavanagh P. Alpha-1-antitrypsin deficiency presenting as bronchiectasis. *Br J Dis Chest* 1985;79(3):301–304.
39. Plantier L, Marchand-Adam S, Antico VG, Boyer L, De Coster C, Marchal J, Bachoual R, Mailleux A, Boczkowski J, Crestani B. Keratinocyte growth factor protects against elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007;293(5): L1230–L1239.
40. Zheng T, Zhu Z, Wang Z, Homer RJ, Ma B, Riese RJ Jr, Chapman HA Jr, Shapiro SD, Elias JA. Inducible targeting of IL-13 to the adult lung causes matrix metalloproteinase- and cathepsin-dependent emphysema. *J Clin Invest.* 2000;106(9):1081–1093.
41. Churg A, Zay K, Shay S, Xie C, Shapiro SD, Hendricks R, Wright JL. Acute cigarette smoke-induced connective tissue breakdown requires both neutrophils and macrophage metalloelastase in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002;27(3):368–374.

42. Churg A, Wang RD, Tai H, Wang X, Xie C, Wright JL. Tumor necrosis factor- α drives 70% of cigarette smoke-induced emphysema in the mouse. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(5):492–498.
43. Yoshida S, Minematsu N, Chubachi S, Nakamura H, Miyazaki M, Tsuduki K, Takahashi S, Miyasho T, Iwabuchi T, Takamiya R, Tateno H, Mouded M, Shapiro SD, Asano K, Betsuyaku T. Annexin V decreases PS-mediated macrophage efferocytosis and deteriorates elastase-induced pulmonary emphysema in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2012;303(10):L852-L860.
44. Kreisel D, Nava RG, Li W, Zinselmeyer BH, Wang B, Lai J, Gelman AE, Krupnick AS, Miller MJ. In vivo two-photon imaging reveals monocyte-dependent neutrophil extravasation during pulmonary inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(42):18073–18078.
45. Nowak D, Głównczyńska I, Piasecka G. Chemotactic activity of elastin derived peptides for human polymorphonuclear leukocytes and their effect on hydrogen peroxide and myeloperoxidase release. *Arch Immunol Ther Exp* 1989;37(5-6):741–748.
46. Ohnishi K, Takagi M, Kurokawa Y, Satomi S, Konttinen YT. Matrix metalloproteinase-mediated extracellular matrix protein degradation in human pulmonary emphysema. *Lab Invest*. 1998;78(9):1077–1087.
47. Shapiro SD. Animal models for COPD. *Chest* 2000;117(5 suppl 1):223S–227S.
48. Ntayi C, Labrousse A-L, Debret R, Birembaut P, Bellon G, Antonicelli F, Hornebeck W, Bernard P. Elastin-derived peptides upregulate matrix metalloproteinase-2-mediated melanoma cell invasion through elastin-binding protein. *J Invest Dermatol*. 2004;122(2):256–265.

49. Brooks BR, Bruccoleri RE, Olafson BD, States DJ, Swaminathan S, Karplus M. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J Comp Chem*. 1983 ; 2 : 187–217.
50. Brooks BR, Brooks CL 3rd, Mackerell AD Jr, Nilsson L, Petrella RJ, Roux B, Won Y, Archontis G, Bartels C, Boresch S, Caflisch A, Caves L, Cui Q, Dinner AR, Feig M, Fischer S, Gao J, Hodoscek M, Im W, Kuczera K, Lazaridis T, Ma J, Ovchinnikov V, Paci E, Pastor RW, Post CB, Pu JZ, Schaefer M, Tidor B, Venable RM, Woodcock HL, Wu X, Yang W, York DM, Karplus M. CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem*. 2009;30(10):1545–1614.
51. F. MacKerell, AD Jr, Bashford D, Bellott M, Dunbrack RL Jr, Evanseck JD, Field MJ, Fischer S, Gao J, Guo H, Ha S, Joseph-MacCarthy D, Kuchnir L, Kuczera K, Lau FTK, Mattos C, Michnick S, Ngo T, Nguyen DT, Prodhom B, Reiher WE III, Roux B, Schlenkrich M, Smith JC, Stote R, Straub J, Watanabe M, Wiorkiewicz-Kuczera J, Yin D, Karplus M. All-atom potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins. *J Phys Chem B*. 1998;102():3586–3616.
52. Ryckaert JP, Ciccotti G, Berendsen HJC. Numerical integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of n-Alkanes. *J Comp Phys*. 1977;23():327–341
53. Steinbach PJ, Brooks BR. New spherical-cutoff methods for longrange forces in macromolecular simulation. *J Comput Chem*. 1994;15():667–683.
54. Hutchinson EG, Thornton JM. A revised set of potentials for beta-turn formation in proteins. *Protein Sci*. 1994;3(12):2207–2216.

55. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem.* 1998;19():1639–1662.
56. Hinek A, Rabinovitch M. 67-kD elastin-binding protein is a protective “companion” of extracellular insoluble elastin and intracellular tropoelastin. *J Cell Biol.* 1994;126(2):563–574.

II. Résultats complémentaires

1. Résultats complémentaires sur les séquences PGXXP et VGXXP

Des simulations de dynamique moléculaire préalables à ce travail et réalisées sur 128 peptides issus de la séquence de la tropoélastine humaine et contenant tous la séquence GXXP, nous ont permis de tirer quelques conclusions quant à l'importance de certains résidus situés avant, après, ou au centre de ce motif. Ainsi, nous avons observé qu'un résidu situé avant le motif GX_1X_2P augmentait presque de moitié les pourcentages de coudes β de type VIII obtenus sur le motif GX_1X_2P . Par ailleurs, deux résidus particuliers, lorsqu'ils se trouvaient en position centrale X_1 ou X_2 , semblaient avoir une importance prépondérante sur le repliement en coudes β de ce motif : la proline et la glycine. La glycine en position centrale X_1 ou X_2 ainsi que la proline en position X_2 avaient un rôle plutôt déstabilisant tandis que la

proline en position X_1 était plutôt favorable à l'obtention d'une coude beta de type VIII sur la séquence GX_1X_2P . Enfin, l'ajout d'un résidu après le motif GX_1X_2P ne semblait pas avoir d'influence notable sur le repliement en coude β de type VIII de ce motif, et ce, quelle que soit la nature de sa chaîne latérale. Il a pourtant été suggéré expérimentalement que la présence d'une glycine après le motif GX_1X_2P était indispensable à l'activité biologique de ces peptides (Brassart et al. 2001).

Les résultats obtenus *in vitro* présentés dans l'article précédent, semblent toutefois indiquer que l'absence de la glycine en position C-terminale, comme dans la séquence PGAIP par exemple, n'entrave pas la fixation du peptide sur l'EBP. Forts de ces différentes constatations, nous avons donc étudié, par modélisation moléculaire, de nouveaux peptides obtenus à partir des séquences VGVAP et PGAIP par mutation de leurs résidus centraux. La génération de tous les mutants possibles (VGX_1X_2P et PGX_1X_2P) n'étant pas envisageable, nous avons sélectionné certaines séquences en choisissant comme résidus en position centrale *i*) les résidus déjà présents dans ces deux séquences, à savoir l'alanine et la valine en position X_1 et l'alanine et l'isoleucine en position X_2 , *ii*) des résidus ayant une plus forte propension à adopter les valeurs dièdres nécessaires à la formation d'une coude β de type VIII (Hovmöller S, Zhou T, Ohlson T., 2002), comme par exemple, la serine et la thréonine en position X_1 et la thréonine et la valine en position X_2 , et *iii*) la proline en position X_1 puisque les simulations réalisées antérieurement ont montré son influence positive pour la stabilisation des coudes β sur GX_1X_2P .

Nous avons réalisés deux types de calculs : des simulations de dynamique moléculaire afin d'évaluer la propension de peptides à se replier en coude beta de type VIII sur la séquence $GXXP$, et des calculs de docking moléculaire afin d'évaluer l'affinité de ces peptides pour le récepteur mimé ici par l'élastase pancréatique porcine (PPE).

1.1. Simulations de Dynamique moléculaire

Les simulations de dynamique moléculaire ont été réalisées avec la version c37b1 de CHARMM (Brooks *et al.* 1983) et le jeu de paramètres 22 (McKerell et al. 1998). Elles ont été effectuées à 300 K, en utilisant l'algorithme de Verlet. Pendant toute la durée des simulations, les longueurs de liaisons entre les atomes lourds et les atomes d'hydrogène ont été maintenues fixes à l'aide de l'algorithme SHAKE (Ryckaert et al. 1977), permettant l'utilisation d'un pas d'intégration de 2 fs. Les interactions non liantes ont été calculées dans

un rayon de 14 Å, en introduisant une troncature avec la fonction FORCE-SWITCH pour les interactions électrostatiques et la fonction VSHIFT pour les interactions de van der Waals entre 10 et 12 Å.

Nous avons choisi une structure de départ du peptide en conformation étendue afin de ne pas influencer le repliement du peptide. Le peptide a ensuite été plongé dans une boîte d'eau (modèle TIP3P, Jorgensen et al., 1983) précédemment équilibrée de 40 Å d'arête et les molécules de solvant situées à une distance inférieure à 2,8 Å des atomes lourds ont été éliminées. Une constante diélectrique de 1,0 et des conditions périodiques aux limites ont été appliquées. Après la phase de solvation, deux phases de minimisation ont été effectués en maintenant tout d'abord le peptide fixe et en minimisant le solvant puis en maintenant le solvant fixe et en minimisant le peptide. Ces 2 phases ont été répétées à nouveau avant de minimiser l'ensemble du système (peptide + solvant). La température du système a ensuite été progressivement amenée à 300 K durant 100 ps. La phase d'équilibrage du système s'est déroulée en deux étapes successives de 100 ps chacune. La phase de production proprement dite, à partir de laquelle seront extraites les informations structurales et dynamiques, a duré 15 ns pour chacun des peptides simulés.

L'ensemble de ces simulations de dynamique moléculaire a été réalisé au centre de calcul ROMEO de l'université de Reims-Champagne-Ardenne. Chaque phase de production (sans compter la préparation du système et l'analyse des résultats) a nécessité environ 300 h de calcul CPU, ce qui correspond au temps qu'il faudrait si l'on effectuait le calcul sur un seul processeur. L'avantage de plateformes telles que ROMEO est la possibilité de lancer ce type de calculs en parallèle sur plusieurs processeurs, ce qui réduit considérablement le temps de calcul. Dans notre cas, les calculs ont généralement été réalisés sur 12 cœurs, soit un temps de calcul effectif de 25h. Bien évidemment, ce type de ressources partagées est géré par un système de queue, ce qui implique un temps d'attente, parfois non négligeable, allant de quelques secondes à plusieurs jours avant que le calcul ne soit effectivement lancé.

Les simulations de dynamique moléculaires ont été analysées en termes de coudes β (Hutchinson et al., 1994) sur les motifs PGXX ou VGXX et GXXP tout au long des trajectoires. Afin de déterminer la présence et la nature de ces coudes, les distances $C\alpha(i) - C\alpha(i+3)$ ainsi que les angles dièdre ϕ et ψ des résidus centraux ($i+1$ et $i+2$) et ont été extraites à l'aide du module CORREL de CHARMM. La fréquence d'apparition de ces

coudes au cours du temps ainsi que les pourcentages (globaux et partiels) de conformations présentant ce type de coude sont présentés *Figures 41* et *42*.

Le comportement structural et dynamique observé au cours des simulations de dynamique moléculaire des différents peptides est extrêmement variable d'un peptide à l'autre, même lorsque les deux peptides ne diffèrent que par la nature du résidu en position N-terminale (Glycine ou Valine). C'est le cas en particulier des couples PGXXP / VGXXP et PGXXP / VGXXP. Alors que le PGXXP présente une conformation en coude β de type VIII durant presque l'intégralité des 15ns de simulation, le peptide VGXXP ne se replie jamais en coude. De façon symétrique, le peptide VGXXP est replié en coude β de type VIII sur plus de 10 ns, alors que le peptide PGXXP ne se replie pas. D'autres couples de peptides en revanche, comme PGXXP / VGXXP, PGXXP / VGXXP ou PGXXP / VGXXP ont des profils très similaires.

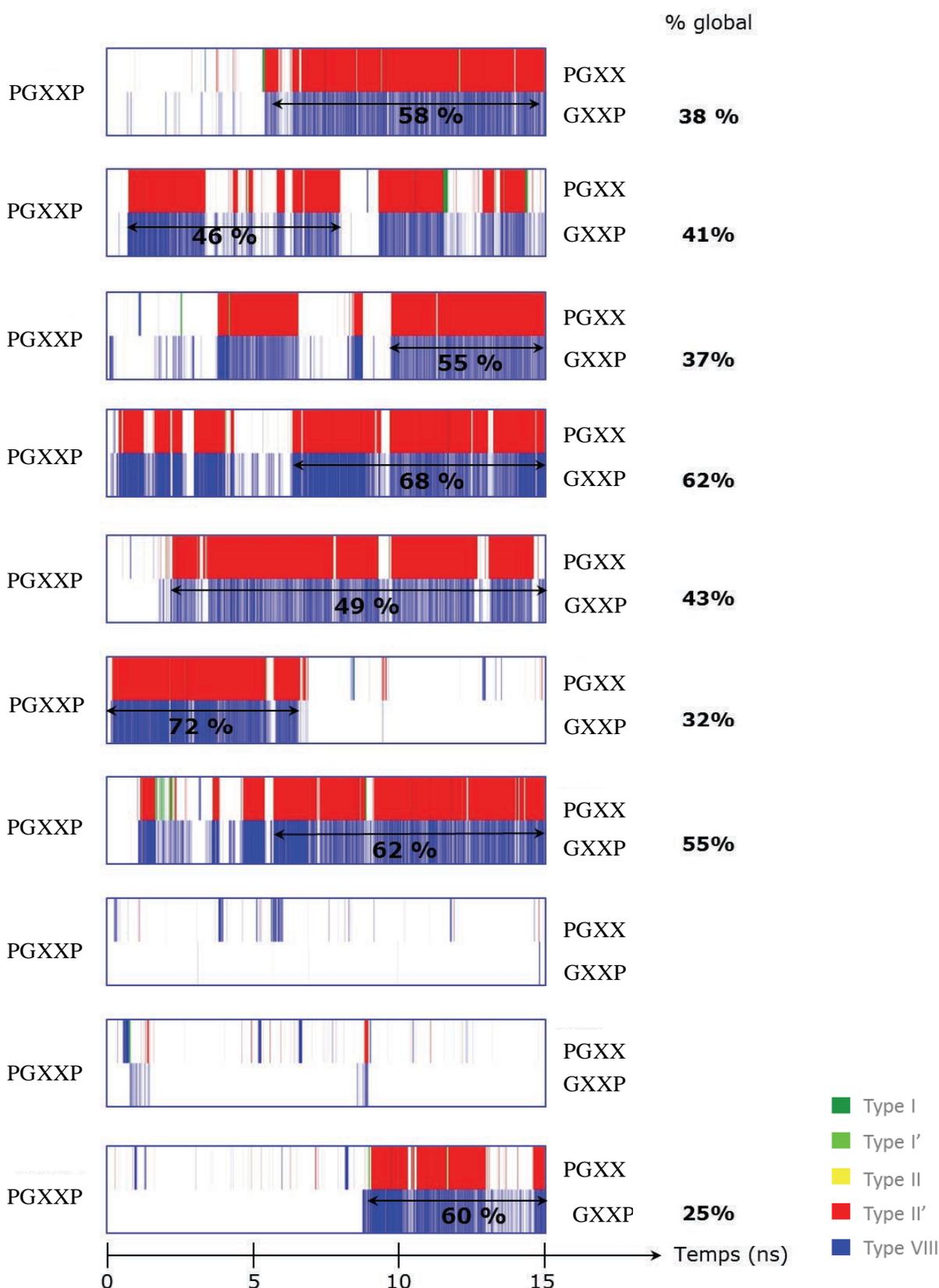


Figure 41 : Fréquences et pourcentages de coudes β présents sur les séquences PGXX et GXXP en fonction du temps lors des simulations de dynamique moléculaire des peptides PGXXP.

Une barre verticale de couleur indique la présence d'un coude β à un temps donné. Seuls les pourcentages de coudes β e type VIII sont indiqués, pourcentage global à droite et pourcentage partiel sur le graphique.

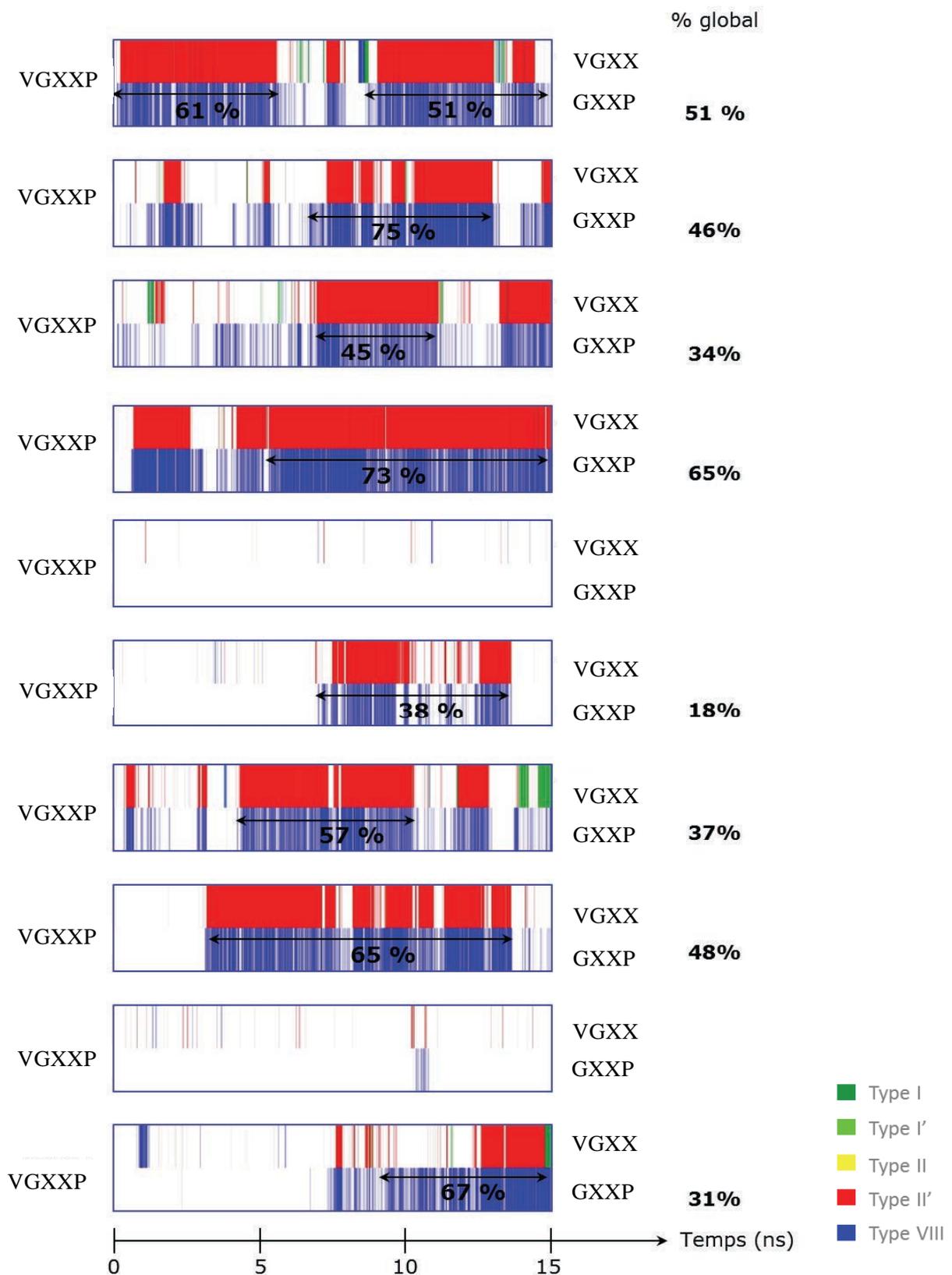


Figure 42 : Fréquences et pourcentages de coudes β présents sur les séquences VGXX et GXXP en fonction du temps lors des simulations des simulations de dynamique moléculaire des peptides VGXXP.

Une barre verticale de couleur indique la présence d'un coude β à un temps donné. Seuls les pourcentages de coudes β e type VIII sont indiqués, pourcentage global à droite et pourcentage partiel sur le graphique.

La vitesse de repliement varie fortement en fonction de la séquence du peptide et de la nature du premier résidu. Certains peptides vont se replier en quelques centaines de

picosecondes comme PGAIP, PGXXP, PGXXP, VGXXP ou VGXXP alors que d'autres peptides mettront plusieurs nanosecondes pour se replier, à l'instar de PGXXP à qui il faudra près de 9 ns pour se replier en coude β de type VIII.

A l'exception des quatre peptides qui ne se replient pas du tout, la durée maximale durant laquelle les peptides vont rester repliés varie également grandement d'un peptide à l'autre, allant de seulement 5 ns pour VGXXP à près de 13 ns pour PGXXP. Tous ces peptides présentent un taux de coudes beta de type VIII supérieur à celui de VGVAPG, qui ne présentait que 44% de ses conformations en coudes β de type VIII. Certains peptides montrent parfois des pourcentages très élevés, pouvant aller jusqu'à 73%, comme par exemple le peptide VGAVP. Dans tous les cas, la présence d'un coude β de type VIII sur le motif GXXP est corrélée avec la présence d'un coude β de type II' sur le motif XGXX.

1.2. Calculs de Docking Moléculaire

Comme nous l'avons dit précédemment, il a été démontré qu'un même anticorps reconnaissait de manière spécifique la séquence (séquence ou peptide S-gal) permettant la fixation de l'élastine à l'EBP, et celle de l'élastase pancréatique porcine (Hinek et Rabinovich 1994). Comme dans nos précédents travaux, nous avons donc choisi la PPE comme modèle structural du récepteur de l'élastine pour nos calculs de docking moléculaire. Nous avons choisi une structure cristallographique résolue avec une précision de 0,95 Å (Katona et al. 2002) et publiée dans la Protein Data Bank sous la référence 1GVK.

Pour effectuer les calculs d'amarrage moléculaire, nous avons utilisé la version 3.0.5 du programme AutoDock (Morris et al. 1998), avec une méthode d'échantillonnage des conformations basée sur l'algorithme génétique de Lamarck. Nous avons utilisé la version 3.0.5 de ce programme, relativement ancienne, plutôt que ses versions plus récentes (4.0 ou 4.2) car ces dernières, contrairement à la version 3.0.5, se sont révélées absolument incapables de reproduire l'interaction du complexe de la PPE avec son inhibiteur naturel (structure pdb 1GVK).

Les calculs de docking moléculaire ont été réalisés au niveau de la partie N-terminale de la PPE (protéine cible). Les grilles, possédant un maillage de $126 \times 126 \times 126$ points avec un espacement de 0,21 Å entre les points de cette grille, ont donc été centrées sur cette région.

Pour chaque peptide, 4 cycles de 250 runs ont été effectués, avec une population initiale de 50 individus, un maximum de 1.700.000 générations et de 500.000 évaluations énergétiques. Les paramètres par défaut d'AutoDock pour l'algorithme génétique de Lamarck et l'algorithme de recherche conformationnelle de Sollis et Wet ont été utilisés. L'interface graphique AutoDockTools (ADT) a été utilisée pour préparer les fichiers d'entrée nécessaires aux différentes étapes de calculs et pour analyser les résultats.

A l'issue de chaque run, la meilleure solution en termes d'énergie d'interaction est conservée et l'ensemble des conformations ainsi obtenues sont analysées et regroupées en familles de conformations (clusters) avec un seuil de RMSD de 1 Å. Ainsi, pour chaque cycle de 250 runs, 250 conformations sont conservées, chacune d'elles correspondant à la conformation optimale obtenue à l'issue de chaque run. Elles sont ensuite regroupées par cluster de conformations proches, de sorte qu'à l'intérieur de chaque cluster, le RMSD entre deux conformations soit toujours inférieur ou égal à 1 Å.

Dans le *Tableau 6* sont reportées les caractéristiques des meilleurs modèles d'interaction obtenus par docking pour les différents peptides PGX_1X_2P et VGX_1X_2P . Pour chaque structure reportée, le numéro du cluster auquel elle appartient ainsi que la taille du cluster sont indiquées. Ainsi, le cluster n°1 contient une ou plusieurs structures de conformations proches parmi lesquelles la structure de plus basse énergie. Plus un cluster est peuplé, plus les conformations correspondantes peuvent être considérées comme favorables. Sont également reportées dans ce tableau les caractéristiques du coude observé sur la séquence GX_1X_2P : la distance entre les atomes C_α de la glycine et de la proline ainsi que les angles φ et ψ des résidus centraux X_1 et X_2 .

Séquence peptidique	n° du cluster	Taille du cluster	Distance Cα (i) - Cα (i+3) (Å)	Résidu X ₁		Résidu X ₂		Nombre de liaisons H
				φ	ψ	φ	ψ	
PGXXP	1	77	7,9	-98,1	-28,2	-144,8	142,5	8
PGXXP	2	18	7,3	-89,2	-43,4	-148,7	122,2	5
PGXXP	1	33	8,2	-86,7	-32,8	-148,1	145,4	7
PGXXP	1	26	7,1	-103,05	-44,8	-121,5	144,2	6
PGXXP	1	69	7,4	-57,8	-50,3	-130,8	134,4	4
PGXXP	1	17	6,5	-66,4	-58,3	-101,1	147,7	7
PGXXP	1	14	7,2	-149,6	-58,6	-122,9	142,8	8
PGXXP	1	7	7,3	-148,5	-61,6	-117,7	144,3	10
PGXXP	1	46	8	-90,6	-50,7	-126,8	155,1	7
PGXXP	1	14	7,1	-101,2	-49,7	-121,4	146	5
VGXXP	1	37	8,1	-92,3	-40	-137,7	146,7	8
VGXXP	1	13	7,2	-88,8	-53,7	-125,4	154	5
VGXXP	3	7	7,5	-142,6	-39,4	-117,7	144,3	12
VGXXP	1	20	7,2	-97,6	-41,6	-134	139,5	5
VGXXP	/	/	/	/	/	/	/	/
VGXXP	/	/	/	/	/	/	/	/
VGXXP	1	2	6,8	-148,9	-53,8	-113,6	143,9	7
VGXXP	1	2	7,6	-118,3	-77	-128,5	150,8	8
VGXXP	1	7	6,6	-88,1	-36,5	-137,6	124,5	7
VGXXP	1	12	6,9	-91,3	-55,8	-124,3	144,8	8

Tableau 6 : Caractéristiques des meilleures structures obtenues par docking entre la PPE et les différents peptides PGX₁X₂P et VGX₁X₂P.

Pour la quasi-totalité des différents peptides testés (à l'exception de VGXXP et VGXXP pour lesquels le programme ne parvient pas à trouver de modèle d'interaction probant), les conformations de plus basses énergies obtenues privilégient une interaction entre le peptide et la séquence équivalente à S-gal de la PPE. Cette interaction se fait via un coude β de type VIII sur la séquence GXXP, parfois légèrement distordu. Pour être classé en coude β de type VIII la distance entre les Cα de la glycine (résidu *i*) et de la proline (résidu *i* + 3) doit être inférieure à 7 Å. Certains peptides rentrent parfaitement dans cette catégorie alors que pour la plupart une augmentation plus ou moins importante de cette distance est observée. De même pour la valeur des angles dièdres. Les valeurs des angles dièdres d'un coude β de type VIII canonique sont : φ(*i* + 1)=-60.0°, ψ(*i* + 1)=-30.0°, φ(*i* + 2) = - 120.0°, ψ(*i* + 2) = 120.0°. Une tolérance de ±30° est accordée à trois de ces angles et ±40° pour le quatrième. Si une variation est observée sur ces valeurs, le coude est alors considéré comme déformé. On peut observer ici un mélange de coude β de type VIII canoniques et déformés selon les critères d'angles et de distance entre les Cα. Comme dans nos précédents calculs, le coude β de type VIII du motif GXXP (déformé ou non) se positionne autour du résidu Gln-8 de la PPE et l'interaction est stabilisée par plusieurs liaisons hydrogène (*Figure 43*).

Il est intéressant de remarquer que pour la grande majorité des peptides testés, on obtient des tailles de cluster très conséquentes, bien plus que pour les peptides de référence VGVAPG et PGAIPG pour lesquels on obtenait 4 à 6 conformations par cluster. C'est le cas tout particulièrement pour les peptides possédant une proline à leur extrémité N-terminale, qui montrent des clusters contenant jusqu'à 77 conformations de structures proches.

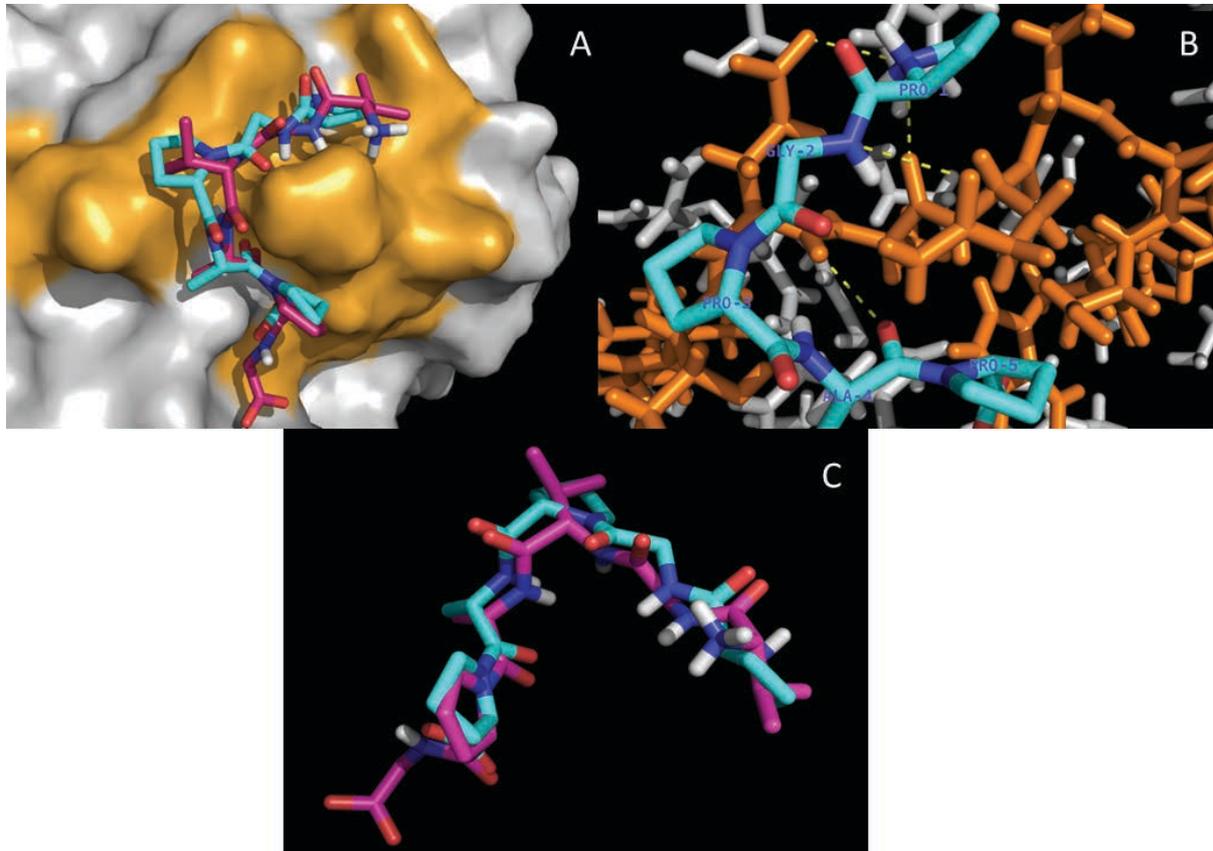


Figure 43 : Caractéristiques de l'interaction prédite par AutoDock entre VGVAPG (rose), PGXXP (bleu) et la séquence S-gal (orange) présente à la surface de la PPE (gris).

(A) Vue globale, (B) Formation de liaisons hydrogène (pointillés jaunes) entre les peptides et la séquence S-gal de la PPE stabilisant l'interaction et (C) Superposition des structures des ligands (peptides) en interaction montrant une même orientation spatiale des chaînes latérales et groupements atomiques de VGVAPG et PGPAP.

En se focalisant sur les peptides présentant des clusters de grande taille (≥ 20 conformations), on retiendra plus particulièrement parmi les peptides PGXXP, PGXXP, PGXXP et PGXXP, et parmi les peptides VGXXP, VGXXP et VGXXP. Ces peptides ont en effet, outre leur forte capacité à interagir avec S-gal, une grande stabilité structurale observée en dynamique moléculaire.

2. Résultats complémentaires sur le peptide GVGVP

La nécessité d'une glycine en position C-terminale pour l'activité de peptides contenant la séquence GXXP a été suggérée par B. Brassart et collaborateurs (Brassart *et al.* 2001) qui ont étudié la capacité de différents peptides à induire la production de pro-MMP-1 par des fibroblastes. Cette conclusion est principalement basée sur l'inactivité du peptide GVGVP comparé au peptide bien connu VGVAPG et au peptide GVAPGV, qui montrent tous les deux une forte propension à induire la production de pro-MMP-1 par les fibroblastes humains.

Dans notre démarche expérimentale, afin de pouvoir confirmer ou infirmer l'importance de la glycine dans l'activité des peptides contenant la séquence GXXP, nous avons préféré étudier des peptides basés sur la séquence XGXXP, c'est-à-dire ne possédant pas de glycine C-terminale, plutôt que de tester le peptide GVGVP. En effet, les résultats obtenus précédemment sur les différents peptides issus de mutations sur PGAIP ou VGVAP montre combien le comportement structural et dynamique varie d'un peptide à l'autre par la simple mutation $P \leftrightarrow V$ en position N-terminale par exemple. Il semble donc difficile de prédire si l'inactivité du peptide GVGVP est effectivement due à l'absence de la glycine en position C-terminale ou à sa présence en position N-terminale.

Il nous toutefois semblé judicieux d'étudier le peptide GVGVP par dynamique moléculaire et docking, pour tenter d'expliquer les raisons de son inactivité. Ces simulations ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour les peptides VGXXP ou PGXXP. Sur la *Figure 44* sont représentées la distance $C_{\alpha}-C_{\alpha}$ entre les résidus Gly-3 et Pro-6 ainsi que la présence des coudes beta de type VIII au cours de la trajectoire. Ces résultats montrent que le peptide GVGVP, contrairement au peptide inactif GGVP étudié dans l'article, se replie en coude β de type VIII sur GVAP après un peu plus de 3 ns, atteignant même des pourcentages de coudes très élevés (plus de 90%) entre 3,5 et 8,5 ns. Toutefois, dans la dernière partie de la simulation, la distance $C_{\alpha}-C_{\alpha}$ montre une nette augmentation de sa valeur, autour de 7,7 Å, avec des fluctuations beaucoup plus importantes. Ce changement conformationnel est corrélé avec le changement de structure sur la séquence VGVA, passant d'un coude β de type II' à un coude β de type I.

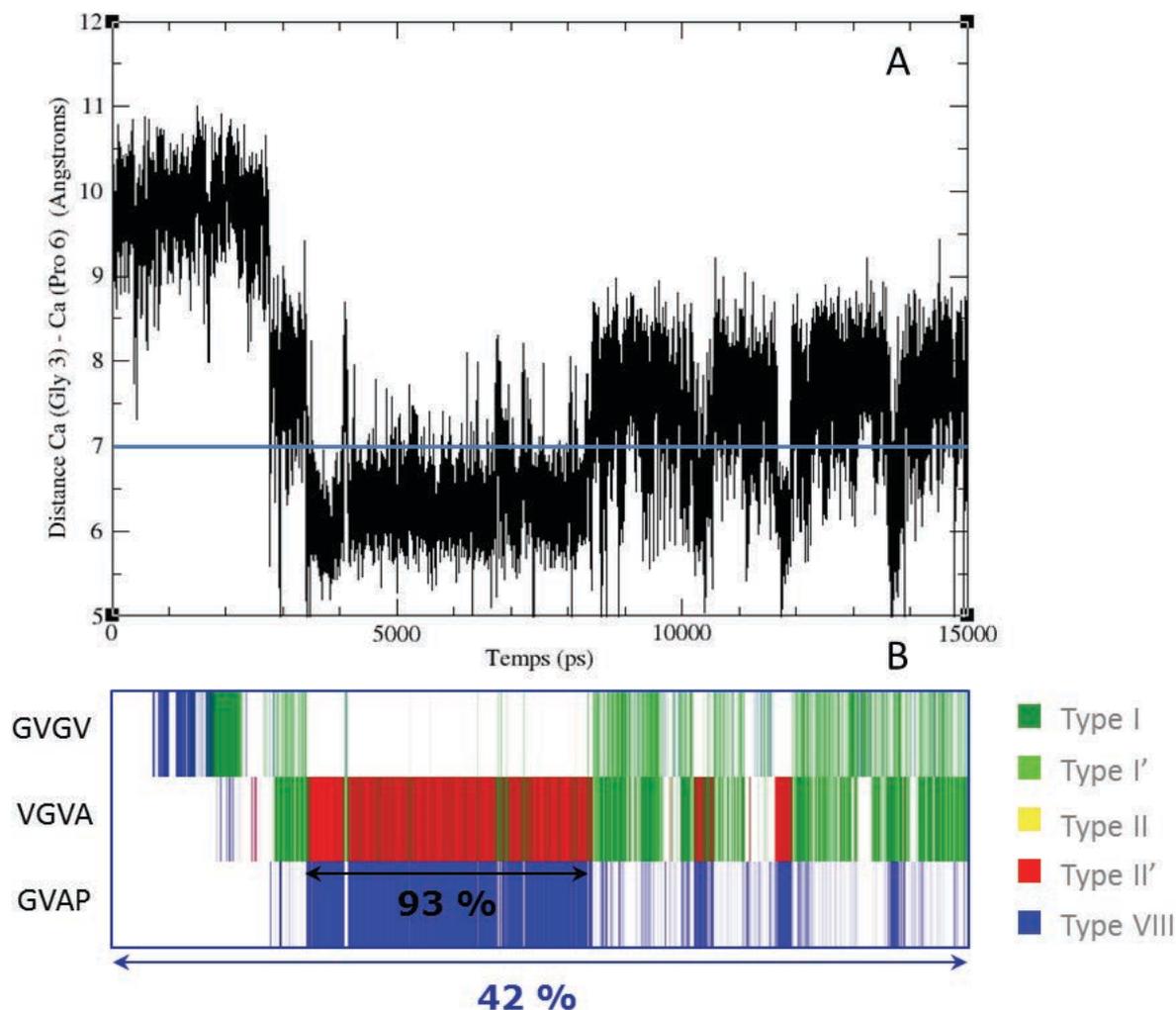


Figure 44 : Evolutions temporelles de (A) la distance C_α-C_α entre les résidus Gly-3 et Pro-6 et (B) la présence des coudes β sur la séquence GVG VAP au cours de la trajectoire de dynamique moléculaire.

Les calculs de docking réalisés sur le peptide GVG VAP montrent deux ensembles de conformations majoritaires différents au voisinage de S-gal (Figure 45). Le premier modèle (modèle « classique ») correspond au même mode d'interaction que celui observé pour les autres peptides, avec un coude β de type VIII sur la séquence GVAP, ici déformé au niveau des angles dièdre φ (Val 3) et ψ (Ala 5), mais se positionnant toujours autour du résidu Gln-8 de la PPE. Le deuxième modèle (modèle « reverse »), plus fréquemment observé en docking, montre le peptide se positionnant de manière inversée par rapport à l'autre modèle, dans une conformation plus étendue, sans coude β (distance C_α (Gly 3) – C_α (Pro 6) = 10.2 Å).



Figure 45 : Illustration des deux modèles d'interaction observés par docking pour le peptide GVGVP.

Le modèle « classique » est représenté en bleu, et le modèle « reverse » en rose.

Deux hypothèses peut donc être émises pour expliquer l'inactivité de ce peptide : sa flexibilité, probablement due à la présence de la glycine en position N-terminale, et les variations conformationnelles qui en découlent ou bien un mode d'interaction différent des autres peptides contenant la séquence GXXP qui bloquerait alors le récepteur et n'entraînerait pas d'activité. Dans l'état actuel de nos connaissances, il est difficile de privilégier l'une ou l'autre de ces hypothèses, d'autres calculs sont nécessaires sur cette séquence et/ou sur des mutants de celle-ci.

PARTIE 5 : Conclusion/Discussion et Perspectives

La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est une pathologie inflammatoire pulmonaire complexe dont l'emphysème est la composante majoritaire et le tabac le principal facteur étiologique. Cette pathologie entraîne une diminution progressive et irréversible des capacités respiratoires. La réponse inflammatoire chronique associée à la BPCO implique à la fois les cellules de l'immunité innée et les cellules de l'immunité adaptative. L'infiltration massive de polynucléaires neutrophiles (PN) et de macrophages aux temps précoces de la maladie s'accompagne de la sécrétion, par ces cellules, de nombreuses protéases dont les taux tissulaires vont rapidement dépasser les capacités de défense du poumon via la production d'inhibiteurs protéasiques (Owen *et al.*, 2008). Ces protéases vont activement participer à la dégradation de la matrice extracellulaire qui assure l'intégrité du parenchyme pulmonaire. Plus spécifiquement, les protéases à activité élastinolytique vont induire une dégradation massive de l'élastine qui assure l'élasticité du poumon. Ceci conduit à la genèse de peptides solubles d'élastine dont des taux élevés sont retrouvés dans les différents liquides biologiques des patients atteints d'emphysème (Schriver *et al.*, 1992 ; Betsuyaku *et al.*, 1996 ; Dupont A. *et al.*, 2013).

Notre laboratoire étudie depuis plusieurs années le rôle des peptides issus de la dégradation de l'élastine dans la régulation des cellules immunitaires en situation normale et pathologique. Nos travaux sur les peptides d'élastine nous ont permis d'identifier pour la première fois le récepteur de l'élastine à la surface des cellules immunitaires humaines et en particulier à la surface des LT (Debret R *et al.*, 2005). Nous avons également décrit que le peptide VGVAPG oriente la synthèse par les lymphocytes T de cytokines de type Th-1 et permet également la réversion d'un profil Th-2 préétabli vers un profil de type Th-1 (Debret R *et al.*, 2005). Par ailleurs, nous avons observé que le peptide VGVAPG régule la synthèse des cytokines inflammatoires en contrôlant l'expression du facteur de transcription NF- κ B dans des monocytes humains activés par le LPS ou dans des cellules de mélanome (Debret R *et al.*, 2006 ; Baranek T *et al.*, 2007). Enfin, nous avons montré que les propriétés migratoires des PN et leur capacité à phagocyter et à détruire les agents pathogènes ainsi qu'à synthétiser des cytokines pro-inflammatoires en réponse au peptide VGVAPG sont altérées chez les patients BPCO (Dupont A. *et al.*, 2013).

Sur la base des données de la littérature et de nos propres données expérimentales, le travail présenté dans ce manuscrit de thèse a consisté, dans une première approche, en l'étude de la capacité des peptides d'élastine à induire un emphysème chez l'animal. Nous avons

montré que l'instillation intra-trachéale d'une dose unique du peptide VGVAPG à des souris sauvages permet d'obtenir, en 21 jours, une inflammation chronique et une dégradation du parenchyme pulmonaire similaires à celles obtenues après instillation d'élastase pancréatique porcine (PPE) décrite dans la littérature comme responsable d'un emphysème chez la souris. Ces effets délétères ne sont pas spécifiques du peptide VGVAPG puisque le peptide PGAIPG produit des effets comparables dans des conditions expérimentales similaires. Ces résultats démontrent pour la première fois et de façon directe le rôle essentiel des peptides d'élastine dans la physiopathologie de la BPCO et en particulier de l'emphysème. Le fait qu'une administration unique du peptide VGVAPG ou du peptide PGAIPG soit suffisante pour déclencher l'ensemble des mécanismes conduisant au développement d'un emphysème montre, d'une part l'importance des premiers signaux déclenchés dans les stades précoces de la maladie et qui apparaissent clairement comme des éléments clés orientant l'ensemble de la pathologie et, d'autre part, la nécessité de prendre définitivement en compte les peptides d'élastine dans l'initiation de la maladie emphysémateuse.

Dans une seconde approche nous sommes partis d'un travail réalisé par l'enseignant-chercheur responsable des études de modélisation au sein de notre laboratoire. Ce travail montrait que l'interaction du peptide VGVAPG avec le domaine S-gal de la sous-unité EBP du récepteur à l'élastine nécessitait le repliement en coude β de type VIII du peptide (Moroy *et al* 2009). Préalablement, une étude avait suggéré que la glycine en position C-terminale sur les peptides d'élastine était nécessaire pour l'activité biologique du peptide (Brassart *et al.* 2001). Sur la base de ces données nous avons, dans un premier temps, réalisé des études de modélisation moléculaire sur les séquences peptidiques VGVAP et PGAIP obtenues par délétion de la glycine en position C-terminale des peptides fonctionnels VGVAPG et PGAIPG. Ceci nous a permis d'identifier le peptide PGAIP comme un peptide favorablement replié en coude β de type VIII. Ce peptide interagit avec la sous-unité EBP et est capable de bloquer les effets chimio-attractants du peptide VGVAPG dans des expériences de pré-incubation et d'antagoniser ces mêmes effets dans des expériences de co-incubation *in vitro*. Par ailleurs, le peptide PGAIP co-administré avec le peptide VGVAPG *in vivo* s'oppose aux effets délétères du peptide VGVAPG. Cependant, si le pouvoir antagoniste du peptide PGAIP est important il reste néanmoins incomplet. L'efficacité du peptide PGAIP à limiter les effets délétères du peptide VGVAPG et leurs impacts sur l'emphysème pourrait ouvrir la voie à une nouvelle classe de molécules à effets pharmacologiques. Cependant, ceci ne pourra être une réalité que si nous sommes capables d'identifier d'autres analogues peptidiques capables d'exercer un effet antagoniste complet.

Nous avons donc entrepris, dans un travail récent, de nouvelles simulations de dynamique moléculaire et de docking basées sur de nouvelles approches *in silico* réalisées sur différents peptides de séquences PGXXP et VGXXP. Les premiers résultats obtenus et présentés dans ce manuscrit montrent une très grande hétérogénéité entre les différents peptides étudiés. En dynamique moléculaire, la présence d'une valine ou d'une proline en première position semble influencer différemment le repliement en coude β de type VIII selon la nature des deux résidus centraux. En effet, certains peptides ne présentant que cette unique différence montrent un comportement opposé. C'est le cas du couple PGXXP/VGXXP. PGXXP semble avoir une conformation extrêmement stable en coude β de type VIII durant toute la simulation alors que VGXXP ne se replie absolument pas. Aucune spécificité particulière de séquence ne semble pour l'instant pouvoir expliquer la vitesse de repliement ainsi que la stabilité du repliement en coude β de type VIII dans le temps. Les peptides se repliant rapidement et ayant une grande stabilité au cours du temps pourrait être de meilleurs candidats dans la recherche d'antagonistes du VGVAPG. Les simulations de docking moléculaire tendent à démontrer que les peptides ayant une proline à leur extrémité N-terminale possèdent une plus grande propension à se lier au peptide S-gal présent dans la sous-unité EBP. En effet, ils présentent des "clusters" de plus basses énergies beaucoup plus peuplés que les peptides ayant une valine à leur extrémité N-terminale. On peut également noter que les conformations se liant à S-gal ne présentent pas toutes un coude β de type VIII canonique. De nombreuses conformations montrent effectivement un coude déformé, dû à une légère ouverture du coude (distance $C\alpha-C\alpha > 7 \text{ \AA}$) ou à de petites variations des valeurs d'angles dièdres. Pour identifier un antagoniste du peptide VGVAPG efficace et répondant à nos exigences, il semble donc impératif de sélectionner un peptide ayant une forte propension à se replier de façon durable en coude β de type VIII et possédant un cluster de plus basse énergie très peuplé en docking moléculaire. Les meilleurs candidats sembleraient donc être les peptides PGXXP, VGXXP, PGXXP, VGXXP ou encore PGXXP. En effet ils présentent un pourcentage de coude β de type VIII très élevé au cours des simulations de DM et ce, sur une longue durée. Ils montrent en outre une forte capacité à se lier à S-gal, avec des clusters de conformations de plus basses énergies extrêmement peuplés.

De l'ensemble du travail présenté dans ce manuscrit de thèse nous pouvons conclure *i)* que les peptides d'élastine sont des acteurs clés dans le développement d'un emphysème *in vivo*, *ii)* que les peptides d'élastine sont des cibles pharmacologiques à prendre en compte afin de limiter leurs effets sur la pathologie emphysémateuse, *iii)* que les approches de dynamique

moléculaire et de docking que nous développons sont des approches originales permettant d'identifier des analogues peptidiques antagonisant efficacement les effets des peptides d'élastine, et *iv*) que le modèle expérimental d'emphysème murin que nous possédons dans le laboratoire est un modèle adapté à l'évaluation *in vivo* des analogues peptidiques sélectionnés par modélisation.

PARTIE 6 : Bibliographie

Aaron, S D, J B Angel, M Lunau, et al.

2001 Granulocyte Inflammatory Markers and Airway Infection During Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163(2): 349–355.

Abboud, R. T., and S. Vimalanathan

2008 Pathogenesis of COPD. Part I. The Role of Protease-antiprotease Imbalance in Emphysema [State of the Art Series. Chronic Obstructive Pulmonary Disease in High-and Low-income Countries. Edited by G. Marks and M. Chan-Yeung. Number 3 in the Series]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 12(4): 361–367.

Abraham, Edward, Aaron Carmody, Robert Shenkar, and John Arcaroli

2000 Neutrophils as Early Immunologic Effectors in Hemorrhage-or Endotoxemia-induced Acute Lung Injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 279(6): L1137–L1145.

Agusti, A.G.N., A. Noguera, J. Sauleda, et al.

2003 Systemic Effects of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *European Respiratory Journal* 21(2): 347–360.

Albert, M L, B Sauter, and N Bhardwaj

1998 Dendritic Cells Acquire Antigen from Apoptotic Cells and Induce Class I-restricted CTLs. *Nature* 392(6671): 86–89.

Alix, Alain J. P.

1997 Molecular Modeling of Globular Proteins : Strategy 1D \Rightarrow 3D: Secondary Structures and Epitopes. *In Biomolecular Structure and Dynamics*. Gérard Vergoten and Theophile Theophanides, eds. Pp. 121–150. NATO ASI Series, 342. Springer Netherlands.

Ameys, Laurent, and Marian F Young

2002 Mice Deficient in Small Leucine-rich Proteoglycans: Novel in Vivo Models for Osteoporosis, Osteoarthritis, Ehlers-Danlos Syndrome, Muscular Dystrophy, and Corneal Diseases. *Glycobiology* 12(9): 107R–16R.

Anderson, K V

2000 Toll Signaling Pathways in the Innate Immune Response. *Current Opinion in Immunology* 12(1): 13–19.

Antonicelli, Frank, Georges Bellon, Laurent Debelle, and William Hornebeck

2007 Elastin-Elastases and Inflamm-Aging. *In Current Topics in Developmental Biology* Pp. 99–155. Elsevier. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0070215306790056>, accessed April 26, 2013.

Argüeso, Pablo, and Noorjahan Panjwani

2011 Focus on Molecules: Galectin-3. *Experimental Eye Research* 92(1): 2–3.

Bairoch, A, and R Apweiler

1997 The SWISS-PROT Protein Sequence Database: Its Relevance to Human Molecular Medical

Research. *Journal of Molecular Medicine* (Berlin, Germany) 75(5): 312–316.

Banerjee, D., O.A. Khair, and D. Honeybourne

2004 Impact of Sputum Bacteria on Airway Inflammation and Health Status in Clinical Stable COPD. *European Respiratory Journal* 23(5): 685–691.

Baranek, Thomas, Romain Debret, Frank Antonicelli, et al.

2007 Elastin Receptor (spliced Galactosidase) Occupancy by Elastin Peptides Counteracts Proinflammatory Cytokine Expression in Lipopolysaccharide-stimulated Human Monocytes Through NF-kappaB Down-regulation. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950) 179(9): 6184–6192.

Barnes, P J

2000 Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The New England Journal of Medicine* 343(4): 269–280.

Barnes, P. J.

2004 Mediators of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Pharmacological Reviews* 56(4): 515–548.

Barnes, Peter J.

2003 New Concepts in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Annual Review of Medicine* 54(1): 113–129.

2008 The Cytokine Network in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Journal of Clinical Investigation* 118(11): 3546–3556.

Bashir, M M, Z Indik, H Yeh, et al.

1989 Characterization of the Complete Human Elastin Gene. Delineation of Unusual Features in the 5'-flanking Region. *The Journal of Biological Chemistry* 264(15): 8887–8891.

Bedell-Hogan, D, P Trackman, W Abrams, J Rosenbloom, and H Kagan

1993 Oxidation, Cross-linking, and Insolubilization of Recombinant Tropoelastin by Purified Lysyl Oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 268(14): 10345–10350.

Betsuyaku, Tomoko, Masaharu Nishimura, Aya Yoshioka, et al.

1996 Elastin-derived Peptides and Neutrophil Elastase in Bronchoalveolar Lavage Fluid. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 154(3): 720–724.

Blanchevoye, C., N. Floquet, A. Scandolera, et al.

2012 Interaction Between the Elastin Peptide VGVAPG and Human Elastin Binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* 288(2): 1317–1328.

Blood, C H, and B R Zetter

1989 Membrane-bound Protein Kinase C Modulates Receptor Affinity and Chemotactic Responsiveness of Lewis Lung Carcinoma Sublines to an Elastin-derived Peptide. *The Journal of Biological Chemistry* 264(18): 10614–10620.

Bochicchio, Brigida, Amina Ait-Ali, Antonio M. Tamburro, and Alain JP Alix

2004 Spectroscopic Evidence Revealing Polyproline II Structure in Hydrophobic, Putatively Elastomeric Sequences Encoded by Specific Exons of Human Tropoelastin. *Biopolymers* 73(4): 484–493.

Bosman, Fred T, and Ivan Stamenkovic

2003 Functional Structure and Composition of the Extracellular Matrix. *The Journal of Pathology* 200(4): 423–428.

Boulesteix, T., A.-M. Pena, N. Pagès, et al.

2006 Micrometer scale Ex Vivo Multiphoton Imaging of Unstained Arterial Wall Structure. *Cytometry Part A* 69A(1): 20–26.

Brandsma, Corry-Anke, Wim Timens, Marie Geerlings, et al.

2010 Induction of Autoantibodies Against Lung Matrix Proteins and Smoke-induced Inflammation in Mice. *BMC Pulmonary Medicine* 10(1): 64.

Brassart, B.

2000 Conformational Dependence of Collagenase (Matrix Metalloproteinase-1) Up-regulation by Elastin Peptides in Cultured Fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry* 276(7): 5222–5227.

Bressan, G M, and D J Prockop

1977 Synthesis of Elastin in Aortas from Chick Embryos. Conversion of Newly Secreted Elastin to Cross-linked Elastin Without Apparent Proteolysis of the Molecule. *Biochemistry* 16(7): 1406–1412.

Brooks, Bernard R., Robert E. Bruccoleri, Barry D. Olafson, et al.

1983 CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *Journal of Computational Chemistry* 4(2): 187–217.

Brown, P L, L Mecham, C Tisdale, and R P Mecham

1992 The Cysteine Residues in the Carboxy Terminal Domain of Tropoelastin Form an Intrachain Disulfide Bond That Stabilizes a Loop Structure and Positively Charged Pocket. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 186(1): 549–555.

Brown-Augsburger, Patricia, Thomas Broekelmann, Lisa Mecham, et al.

1994 Microfibril-associated Glycoprotein Binds to the Carboxyl-terminal Domain of Tropoelastin and Is a Substrate for Transglutaminase. *Journal of Biological Chemistry* 269(45): 28443–28449.

Brown-Augsburger, Patricia, Thomas Broekelmann, Joel Rosenbloom, and Robert P. Mecham

1996 Functional Domains on Elastin and Microfibril-associated Glycoprotein Involved in Elastic Fibre Assembly. *Biochemical Journal* 318(Pt 1): 149.

Brusselle, Guy G., Guy F. Joos, and Ken R. Bracke

2011 New Insights into the Immunology of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The Lancet* 378(9795): 1015–1026.

Buisine, M P, L Devisme, M C Copin, et al.

1999 Developmental Mucin Gene Expression in the Human Respiratory Tract. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 20(2): 209–218.

Callahan, J W

1999 Molecular Basis of GM1 Gangliosidosis and Morquio Disease, Type B. Structure-function Studies of Lysosomal Beta-galactosidase and the Non-lysosomal Beta-galactosidase-like Protein. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1455(2-3): 85–103.

Casolaro, M A, J F Bernaudin, C Saltini, V J Ferrans, and R G Crystal

1988 Accumulation of Langerhans' Cells on the Epithelial Surface of the Lower Respiratory Tract in Normal Subjects in Association with Cigarette Smoking. *The American Review of Respiratory Disease* 137(2): 406–411.

Castiglione Morelli, M A, F Bisaccia, S Spisani, et al.

1997 Structure-activity Relationships for Some Elastin-derived Peptide Chemoattractants. *The Journal of Peptide Research: Official Journal of the American Peptide Society* 49(6): 492–499.

Chang, C, and J C Houck

1970 Demonstration of the Chemotactic Properties of Collagen. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.) 134(1): 22–26.

Chou, Kuo-Chen

2000 Prediction of Tight Turns and Their Types in Proteins. *Analytical Biochemistry* 286(1): 1–16.

Chung, K. F.

2001 Cytokines in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *European Respiratory Journal* 18(1): 50–59.

Clarke, Adam W., Eva C. Arnsperg, Suzanne M. Mithieux, et al.

2006 Tropoelastin Massively Associates During Coacervation To Form Quantized Protein Spheres †. *Biochemistry* 45(33): 9989–9996.

Cohen, A B, and M Rossi

1983 Neutrophils in Normal Lungs. *The American Review of Respiratory Disease* 127(2): S3–9.

Cosio, Manuel G, Marina Saetta, and Alvar Agusti

2009 Immunologic Aspects of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The New England Journal of Medicine* 360(23): 2445–2454.

Cox, G, J Crossley, and Z Xing

1995 Macrophage Engulfment of Apoptotic Neutrophils Contributes to the Resolution of Acute Pulmonary Inflammation in Vivo. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 12(2): 232–237.

Crooks, S W, D L Bayley, S L Hill, and R A Stockley

2000 Bronchial Inflammation in Acute Bacterial Exacerbations of Chronic Bronchitis: The Role of Leukotriene B4. *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 15(2): 274–280.

- Croxton, Thomas L., Gail G. Weinmann, Robert M. Senior, et al.
2003 Clinical Research in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 167(8): 1142–1149.
- Culav, Elizabeth M., C. Heather Clark, and Mervyn J. Merrilees
1999 Connective Tissues: Matrix Composition and Its Relevance to Physical Therapy. *Physical Therapy* 79(3): 308–319.
- Curtis, J. L., C. M. Freeman, and J. C. Hogg
2007 The Immunopathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Insights from Recent Research. *Proceedings of the American Thoracic Society* 4(7): 512–521.
- D'Agrosa, R M, and J W Callahan
1988 In Vitro Activation of Neuraminidase in the Beta-galactosidase-neuraminidase-protective Protein Complex by Cathepsin C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 157(2): 770–775.
- Darden, Tom, Darrin York, and Lee Pedersen
1993 Particle Mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ Method for Ewald Sums in Large Systems. *The Journal of Chemical Physics* 98(12): 10089–10092.
- Debelle, L., and A M Tamburro
1999 Elastin: Molecular Description and Function. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31(2): 261–272.
- Debret, R, Antonicelli F, Theill A, Hornebeck W, Bernard P, Guenounou M, Le Naour R
2005 Elastin-Derived Peptides Induce a T-Helper Type 1 Polarization of Human Blood Lymphocytes. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 25(7): 1353–1358.
- Debret, Romain, Richard R. Le Naour, Jean-Michel Sallenave, et al.
2006 Elastin Fragments Induce IL-1 β Upregulation via NF- κ B Pathway in Melanoma Cells. *Journal of Investigative Dermatology* 126(8): 1860–1868.
- Demedts, Ingel K., Ken R. Bracke, Geert Van Pottelberge, et al.
2007 Accumulation of Dendritic Cells and Increased CCL20 Levels in the Airways of Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 175(10): 998–1005.
- Denkers, E Y, A Sher, and R T Gazzinelli
1993 CD8+ T-cell Interactions with *Toxoplasma Gondii*: Implications for Processing of Antigen for class-I-restricted Recognition. *Research in Immunology* 144(1): 51–57.
- Djekic, Uros V., Amit Gaggar, and Nathaniel M. Weathington
2009 Attacking the Multi-tiered Proteolytic Pathology of COPD: New Insights from Basic and Translational Studies. *Pharmacology & Therapeutics* 121(2): 132–146.
- Doherty, D E, G P Downey, G S Worthen, C Haslett, and P M Henson

- 1988 Monocyte Retention and Migration in Pulmonary Inflammation. Requirement for Neutrophils. Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology 59(2): 200–213.
- Donaldson, G. C., T. A. R. Seemungal, A. Bhowmik, and J. A. Wedzicha
2002 Relationship Between Exacerbation Frequency and Lung Function Decline in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Thorax 57(10): 847–852.
- Duca, L., C. Blanchevoye, B. Cantarelli, et al.
2007 The Elastin Receptor Complex Transduces Signals Through the Catalytic Activity of Its Neu-1 Subunit. Journal of Biological Chemistry 282(17): 12484–12491.
- Duca, Laurent, Laurent Debelle, Romain Debret, et al.
2002 The Elastin Peptides-mediated Induction of Pro-collagenase-1 Production by Human Fibroblasts Involves Activation of MEK/ERK Pathway via PKA- and PI(3)K-dependent Signaling. FEBS Letters 524(1-3): 193–198.
- Duca, Laurent, Nicolas Floquet, Alain J.P. Alix, Bernard Haye, and Laurent Debelle
2004 Elastin as a Matrikine. Critical Reviews in Oncology/Hematology 49(3): 235–244.
- Dupont, A., S. Dury, V. Gafa, et al.
2013 Impairment of Neutrophil Reactivity to Elastin Peptides in COPD. Thorax 68(5): 421–428.
- Edelson, B T, and E R Unanue
2000 Immunity to Listeria Infection. Current Opinion in Immunology 12(4): 425–431.
- Eid AA, Ionescu AA, L S Nixon, et al.
2001 Inflammatory Response and Body Composition in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 164(8 Pt 1): 1414–1418.
- Essmann, U, Perera L, Berkowitz ML, Darden T, Lee H, Pedersen LG
1995 A Smooth Particle Mesh Ewald Method. The Journal of Chemical Physics 103(19): 8577–8593.
- Eswar N, Webb B, Marti-Remon MA, Madhusudham MS, Eramiam D, Shen MY, Piepper U, Sali A,
2006 Comparative Protein Structure Modeling Using Modeller. Current Protocols in Bioinformatics / Editorial Board, Andreas D. Baxevanis ... [et Al.] Chapter 5: Unit 5.6.
- Ewald, P. P.
1921 Die Berechnung Optischer Und Elektrostatischer Gitterpotentiale. Annalen Der Physik 369(3): 253–287.
- Faurschou, Mikkel, and Niels Borregaard
2003 Neutrophil Granules and Secretory Vesicles in Inflammation. Microbes and Infection / Institut Pasteur 5(14): 1317–1327.
- Faury, G., S. Garnier, A. S. Weiss, et al.
1998 Action of Tropoelastin and Synthetic Elastin Sequences on Vascular Tone and on Free Ca²⁺

Level in Human Vascular Endothelial Cells. *Circulation Research* 82(3): 328–336.

Fazio, Michael J., Marie-Genevieve Mattei, Edith Passage, et al.

1991 Human Elastin Gene: New Evidence for Localization to the Long Arm of Chromosome 7. *American Journal of Human Genetics* 48(4): 696.

Finkelstein, Richard, Richard S. Fraser, Heberto Ghezso, and Manuel G. Cosio

1995 Alveolar Inflammation and Its Relation to Emphysema in Smokers. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 152(5): 1666–1672.

Floquet, Nicolas, Stéphanie Héry-Huynh, Manuel Dauchez, et al.

2004 Structural Characterization of VGVAPG, an Elastin-derived Peptide. *Biopolymers* 76(3): 266–280.

Foster, J A, L Rubin, H M Kagan, et al.

1974 Isolation and Characterization of Cross-linked Peptides from Elastin. *The Journal of Biological Chemistry* 249(19): 6191–6196.

Frances, C, and L Robert

1984 Elastin and Elastic Fibers in Normal and Pathologic Skin. *International Journal of Dermatology* 23(3): 166–179.

Frantz, C., K. M. Stewart, and V. M. Weaver

2010 The Extracellular Matrix at a Glance. *Journal of Cell Science* 123(24): 4195–4200.

Freeman, Christine M., Fernando J. Martinez, MeiLan K. Han, et al.

2009 Lung Dendritic Cell Expression of Maturation Molecules Increases with Worsening Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 180(12): 1179–1188.

Frostedgård, J, A K Ulfgren, P Nyberg, et al.

1999 Cytokine Expression in Advanced Human Atherosclerotic Plaques: Dominance of Pro-inflammatory (Th1) and Macrophage-stimulating Cytokines. *Atherosclerosis* 145(1): 33–43.

Fuchs, P., L. DeBelle, and A. J. P. Alix

2001 Structural Study of Some Specific Elastin Hexapeptides Activating MMP1. *Journal of Molecular Structure* 565: 335–339.

Fuchs, Patrick FJ, and Alain JP Alix

2005 High Accuracy Prediction of B-turns and Their Types Using Propensities and Multiple Alignments. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 59(4): 828–839.

Fülöp, T, Jr, M P Jacob, Z Varga, et al.

1986 Effect of Elastin Peptides on Human Monocytes: Ca²⁺ Mobilization, Stimulation of Respiratory Burst and Enzyme Secretion. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 141(1): 92–98.

Fülöp, T, Jr, S M Wei, L Robert, and M P Jacob

1990 Determination of Elastin Peptides in Normal and Arteriosclerotic Human Sera by ELISA. *Clinical Physiology and Biochemistry* 8(6): 273–282.

Galjart, Niels J., Nynke Gillemans, Alan Harris, et al.

1988 Expression of cDNA Encoding the Human “protective Protein” Associated with Lysosomal B-galactosidase and Neuraminidase: Homology to Yeast Proteases. *Cell* 54(6): 755–764.

Gan, W Q

2004 Association Between Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Systemic Inflammation: a Systematic Review and a Meta-analysis. *Thorax* 59(7): 574–580.

Ganz, Tomas

2002 Antimicrobial Polypeptides in Host Defense of the Respiratory Tract. *Journal of Clinical Investigation* 109(6): 693–697.

Gibson, Mark A., George Hatzinikolas, Jaliya S. Kumaratilake, et al.

1996 Further Characterization of Proteins Associated with Elastic Fiber Microfibrils Including the Molecular Cloning of MAGP-2 (MP25). *Journal of Biological Chemistry* 271(2): 1096–1103.

Gompertz, S, C O’Brien, D L Bayley, S L Hill, and R A Stockley

2001 Changes in Bronchial Inflammation During Acute Exacerbations of Chronic Bronchitis. *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 17(6): 1112–1119.

Goodsell, D S, and A J Olson

1990 Automated Docking of Substrates to Proteins by Simulated Annealing. *Proteins* 8(3): 195–202.

Gordon, Marion K., and Rita A. Hahn

2009 Collagens. *Cell and Tissue Research* 339(1): 247–257.

Gottlieb, Daniel J., Phillip J. Stone, David Sparrow, et al.

1996 Urinary Desmosine Excretion in Smokers with and Without Rapid Decline of Lung Function: The Normative Aging Study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 154(5): 1290–1295.

Grosso, L E, and M Scott

1993a PGAIPG, a Repeated Hexapeptide of Bovine and Human Tropoelastin, Is Chemotactic for Neutrophils and Lewis Lung Carcinoma Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 305(2): 401–404.

Grosso, L E, and M Scott

1993b Peptide Sequences Selected by BA4, a Tropoelastin-specific Monoclonal Antibody, Are Ligands for the 67-kilodalton Bovine Elastin Receptor. *Biochemistry* 32(48): 13369–13374.

- Grumelli, Sandra, David B. Corry, Li-Zhen Song, et al.
2004 An Immune Basis for Lung Parenchymal Destruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Emphysema. *PLoS Medicine* 1(1): e8.
- Hahn, Christopher N., Maria del Pilar Martin, Maria Schröder, et al.
1997 Generalized CNS Disease and Massive GM1-ganglioside Accumulation in Mice Defective in Lysosomal Acid B-galactosidase. *Human Molecular Genetics* 6(2): 205–211.
- Hamilton-Easton, A, and M Eichelberger
1995 Virus-specific Antigen Presentation by Different Subsets of Cells from Lung and Mediastinal Lymph Node Tissues of Influenza Virus-infected Mice. *Journal of Virology* 69(10): 6359–6366.
- Hance, Kirk A., Monika Tatara, Scott J. Ziporin, Jason K. Lee, and Robert W. Thompson
2002 Monocyte Chemotactic Activity in Human Abdominal Aortic Aneurysms: Role of Elastin Degradation Peptides and the 67-kD Cell Surface Elastin Receptor. *Journal of Vascular Surgery* 35(2): 254–261.
- Hayday, A C, S Roberts, and E Ramsburg
2000 Gammadelta Cells and the Regulation of Mucosal Immune Responses. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 162(4 Pt 2): S161–163.
- Henderson, Marilyn, Roman Polewski, Joseph C. Fanning, and Mark A. Gibson
1996 Microfibril-associated Glycoprotein-1 (MAGP-1) Is Specifically Located on the Beads of the Beaded-filament Structure for Fibrillin-containing Microfibrils as Visualized by the Rotary Shadowing Technique. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 44(12): 1389–1397.
- Hinek, A
1996 Biological Roles of the Non-integrin Elastin/laminin Receptor. *Biological Chemistry* 377(7-8): 471–480.
- Hinek, A, and M Rabinovitch
1994 67-kD Elastin-binding Protein Is a Protective “Companion” of Extracellular Insoluble Elastin and Intracellular Tropoelastin. *The Journal of Cell Biology* 126(2): 563–574.
- Hinek, A, D S Wrenn, R P Mecham, and S H Barondes
1988 The Elastin Receptor: a Galactoside-binding Protein. *Science (New York, N.Y.)* 239(4847): 1539–1541.
- Hinek, A., M. Rabinovitch, F. Keeley, Yuko Okamura-Oho, and J. Callahan
1993 The 67-kD Elastin/laminin-binding Protein Is Related to an Enzymatically Inactive, Alternatively Spliced Form of Beta-galactosidase. *Journal of Clinical Investigation* 91(3): 1198.
- Hirai, K, M Miyamasu, T Takaishi, and Y Morita
1997 Regulation of the Function of Eosinophils and Basophils. *Critical Reviews in Immunology* 17(3-4): 325–352.
- Hiraiwa, M.
1999 Cathepsin A/protective Protein: An Unusual Lysosomal Multifunctional Protein. *Cellular and*

Molecular Life Sciences CMLS 56(11-12): 894–907.

Hogg, James C., Fanny Chu, Soraya Utokaparch, et al.

2004 The Nature of Small-airway Obstruction in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *New England Journal of Medicine* 350(26): 2645–2653.

Hornebeck, W, D Brechemier, M P Jacob, C Frances, and L Robert

1984 On the Multiplicity of Cellular Elastases and Their Inefficient Control by Natural Inhibitors. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 167: 111–119.

Houghton, A. M.

2006 Elastin Fragments Drive Disease Progression in a Murine Model of Emphysema. *Journal of Clinical Investigation* 116(3): 753–759.

Hovmoller, S, Zhou, T, Ohlson, T,

2002 Conformations of amino acids in proteins. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography* 58(5): 768–776.

Hunninghake, G W, J M Davidson, S Rennard, et al.

1981 Elastin Fragments Attract Macrophage Precursors to Diseased Sites in Pulmonary Emphysema. *Science (New York, N.Y.)* 212(4497): 925–927.

Hutchinson, E. Gail, and Janet M. Thornton

1994 A Revised Set of Potentials for B-turn Formation in Proteins. *Protein Science* 3(12): 2207–2216.

Indik, Zena, Helena Yeh, Norma Ornstein-Goldstein, et al.

1987 Alternative Splicing of Human Elastin mRNA Indicated by Sequence Analysis of Cloned Genomic and Complementary DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84(16): 5680–5684.

Iozzo, RENATO V., and ALAN D. Murdoch

1996 Proteoglycans of the Extracellular Environment: Clues from the Gene and Protein Side Offer Novel Perspectives in Molecular Diversity and Function. *The FASEB Journal* 10(5): 598–614.

Jacob, Marie-Paule, Tamàs Fülöp, Gabriella Foris, and Ladislav Robert

1987 Effect of Elastin Peptides on Ion Fluxes in Mononuclear Cells, Fibroblasts, and Smooth Muscle Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84(4): 995–999.

Janoff, A, B Sloan, G Weinbaum, et al.

1977 Experimental Emphysema Induced with Purified Human Neutrophil Elastase: Tissue Localization of the Instilled Protease. *The American Review of Respiratory Disease* 115(3): 461–478.

Jorgensen, William L., Jayaraman Chandrasekhar, Jeffrey D. Madura, Roger W. Impey, and Michael L. Klein

1983 Comparison of Simple Potential Functions for Simulating Liquid Water. *The Journal of Chemical Physics* 79(2): 926–935.

Kagan, H M, and P Cai

1995 Isolation of Active Site Peptides of Lysyl Oxidase. *Methods in Enzymology* 258: 122–132.

Kähäri, V. M., Y. Q. Chen, M. M. Bashir, J. Rosenbloom, and J. Uitto

1992 Tumor Necrosis Factor- α Down-regulates Human Elastin Gene Expression. Evidence for the Role of AP-1 in the Suppression of Promoter Activity. *Journal of Biological Chemistry* 267(36): 26134–26141.

Kaliner, M A

1991 Human Nasal Respiratory Secretions and Host Defense. *The American Review of Respiratory Disease* 144(3 Pt 2): S52–56.

Kanazawa, M, A Ishizaka, N Hasegawa, Y Suzuki, and T Yokoyama

1992 Granulocyte Colony-stimulating Factor Does Not Enhance Endotoxin-induced Acute Lung Injury in Guinea Pigs. *The American Review of Respiratory Disease* 145(5): 1030–1035.

Keene, D. R.

2000 Decorin Binds Near the C Terminus of Type I Collagen. *Journal of Biological Chemistry* 275(29): 21801–21804.

Kemp, M, A S Hey, J A Kurtzhals, et al.

1994 Dichotomy of the Human T Cell Response to Leishmania Antigens. I. Th1-like Response to Leishmania Major Promastigote Antigens in Individuals Recovered from Cutaneous Leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology* 96(3): 410–415.

Kheradmand, Farrah, Ming Shan, Chuang Xu, and David B Corry

2012 Autoimmunity in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Clinical and Experimental Evidence. *Expert Review of Clinical Immunology* 8(3): 285–292.

Kielty, C M, T J Wess, L Haston, et al.

2002 Fibrillin-rich Microfibrils: Elastic Biopolymers of the Extracellular Matrix. *Journal of Muscle Research and Cell Motility* 23(5-6): 581–596.

Kielty, Cay M., Michael J. Sherratt, and C. Adrian Shuttleworth

2002 Elastic Fibres. *Journal of Cell Science* 115(14): 2817–2828.

King, M

1987 Rôle of Mucus Viscoelasticity in Clearance by Cough. *European Journal of Respiratory Diseases. Supplement* 153: 165–172.

King, M, and B K Rubin

1999 Mucus-controlling Agents: Past and Present. *Respiratory Care Clinics of North America* 5(4): 575–594.

Knowles, Michael R., and Richard C. Boucher

2002 Mucus Clearance as a Primary Innate Defense Mechanism for Mammalian Airways. *Journal of Clinical Investigation* 109(5): 571–577.

- Koguchi, Yoshinobu, and Kazuyoshi Kawakami
2002 Cryptococcal Infection and Th1-Th2 Cytokine Balance. *International Reviews of Immunology* 21(4-5): 423–438.
- Kumar, S, and M Bansal
1998 Geometrical and Sequence Characteristics of Alpha-helices in Globular Proteins. *Biophysical Journal* 75(4): 1935–1944.
- Lamblin, G, M Lhermitte, A Klein, et al.
1991 The Carbohydrate Diversity of Human Respiratory Mucins: a Protection of the Underlying Mucosa? *The American Review of Respiratory Disease* 144(3 Pt 2): S19–24.
- Lambrecht, B N, J B Prins, and H C Hoogsteden
2001 Lung Dendritic Cells and Host Immunity to Infection. *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 18(4): 692–704.
- Laskin, D L, T Kimura, S Sakakibara, D J Riley, and R A Berg
1986 Chemotactic Activity of Collagen-like Polypeptides for Human Peripheral Blood Neutrophils. *Journal of Leukocyte Biology* 39(3): 255–266.
- Lee, Seung-Hyo, Sangeeta Goswami, Ariel Grudo, et al.
2007 Antielastin Autoimmunity in Tobacco Smoking–induced Emphysema. *Nature Medicine* 13(5): 567–569.
- Li, Bin, and Valerie Daggett
2002 Molecular Basis for the Extensibility of Elastin. *Journal of Muscle Research & Cell Motility* 23(5-6): 561–573.
- Lombard, C., L. Arzel, D. Bouchu, J. Wallach, and J. Saulnier
2006 Human Leukocyte Elastase Hydrolysis of Peptides Derived from Human Elastin Exon 24. *Biochimie* 88(12): 1915–1921.
- Lommatzsch, Marek, Sanja Cicko, Tobias Müller, et al.
2010 Extracellular Adenosine Triphosphate and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 181(9): 928–934.
- Loncharich, R J, and B R Brooks
1989 The Effects of Truncating Long-range Forces on Protein Dynamics. *Proteins* 6(1): 32–45.
- Lopez, A D, and C C Murray
1998 The Global Burden of Disease, 1990-2020. *Nature Medicine* 4(11): 1241–1243.
- Lopez, Alan D, Colin D Mathers, Majid Ezzati, Dean T Jamison, and Christopher J L Murray
2006 Global and Regional Burden of Disease and Risk Factors, 2001: Systematic Analysis of Population Health Data. *Lancet* 367(9524): 1747–1757.

Lusuardi, M., A. Capelli, A. Di Stefano, and C.F. Donner
2002 Lung Mucosal Immunity: immunoglobulin-A Revisited. *European Respiratory Journal* 19(4): 785–786.

Macedo, Rita C., Anaysa P. Bolin, Douglas P. Marin, and Rosemari Otton
2010 Astaxanthin Addition Improves Human Neutrophils Function: In Vitro Study. *European Journal of Nutrition* 49(8): 447–457.

MacNee, W.
2005 Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2(4): 258–266.

Maquart FX, Siméon A, Pasco S, Monboisse JC,
1999 Regulation of cell activity by the extracellular matrix: the concept of matrikines *J Soc Biol* 193(4-5) : 423-8

Maquart, François-Xavier, Sylvie Pasco, Laurent Ramont, William Hornebeck, and Jean-Claude Monboisse
2004 An Introduction to Matrikines: Extracellular Matrix-derived Peptides Which Regulate Cell Activity. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 49(3): 199–202.

McCormack, Francis X., and Jeffrey A. Whitsett
2002 The Pulmonary Collectins, SP-A and SP-D, Orchestrate Innate Immunity in the Lung. *Journal of Clinical Investigation* 109(6): 707–712.

McWilliam, A S, A M Marsh, and P G Holt
1997 Inflammatory Infiltration of the Upper Airway Epithelium During Sendai Virus Infection: Involvement of Epithelial Dendritic Cells. *Journal of Virology* 71(1): 226–236.

Mecham, R P, B D Levy, S L Morris, J G Madaras, and D S Wrenn
1985 Increased Cyclic GMP Levels Lead to a Stimulation of Elastin Production in Ligament Fibroblasts That Is Reversed by Cyclic AMP. *The Journal of Biological Chemistry* 260(6): 3255–3258.

Mecham, Robert P., Aleksander Hinek, Ruth Entwistle, et al.
1989 Elastin Binds to a Multifunctional 67-kilodalton Peripheral Membrane Protein. *Biochemistry* 28(9): 3716–3722.

Medzhitov, R
2001 Toll-like Receptors and Innate Immunity. *Nature Reviews. Immunology* 1(2): 135–145.

Mithieux, Suzanne M., and Anthony S. Weiss
2005 Elastin. *Advances in Protein Chemistry* 70: 437–461.

Monti, Eugenio, Erik Bonten, Alessandra D’Azzo, et al.
2010 Sialidases in Vertebrates: a Family of Enzymes Tailored for Several Cell Functions. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* 64: 403–479.

Moore, B B, T A Moore, and G B Toews

2001 Role of T- and B-lymphocytes in Pulmonary Host Defences. *The European Respiratory Journal: Official Journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology* 18(5): 846–856.

Moroy, G., A. Ostuni, A. Pepe, et al.

2009 A Proposed Interaction Mechanism Between Elastin-derived Peptides and the Elastin/laminin Receptor-binding Domain. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 76(2): 461–476.

Moroy, Gautier, Alain J. P. Alix, and Stéphanie Héry-Huynh

2005 Structural Characterization of Human Elastin Derived Peptides Containing the GXXP Sequence. *Biopolymers* 78(4): 206–220.

Moroy, Gautier

2005 Etude structurale du domaine d'interaction du récepteur de l'élastine.

Approches biochimiques, biophysiques et bioinformatiques

Thèse de doctorat, biomolécule et dynamique cellulaire, Reims, Université de Reims Champagne-Ardenne

Morris, Garrett M., David S. Goodsell, Robert S. Halliday, et al.

1998 Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function. *Journal of Computational Chemistry* 19(14): 1639–1662.

Mosmann, T R, H Cherwinski, M W Bond, M A Giedlin, and R L Coffman

1986 Two Types of Murine Helper T Cell Clone. I. Definition According to Profiles of Lymphokine Activities and Secreted Proteins. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 136(7): 2348–2357.

Muiznieks, Lisa D., Sacha A. Jensen, and Anthony S. Weiss

2003 Structural Changes and Facilitated Association of Tropoelastin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 410(2): 317–323.

Nelson, S, G J Bagby, B G Bainton, et al.

1989 Compartmentalization of Intraalveolar and Systemic Lipopolysaccharide-induced Tumor Necrosis Factor and the Pulmonary Inflammatory Response. *The Journal of Infectious Diseases* 159(2): 189–194.

O'byrne, P M, and D S Postma

1999 The Many Faces of Airway Inflammation. *Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease*. Asthma Research Group. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 159(5 Pt 2): S41–63.

Ochieng, Josiah

1999 The Role of Galectin-3 in the Interactions Between Breast Carcinoma Cells and Elastin. *DTIC Journal of Cellular Biochemistry* 75(3) : 505-514

Oitate, M., T. Hirota, M. Takahashi, et al.

2006 Mechanism for Covalent Binding of Rofecoxib to Elastin of Rat Aorta. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 320(3): 1195–1203.

Oreilly, P, A Gaggar, and J Blalock

2008 Interfering with Extracellular Matrix Degradation to Blunt Inflammation. *Current Opinion in Pharmacology* 8(3): 242–248.

Owen, C. A.

2005 Proteinases and Oxidants as Targets in the Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Proceedings of the American Thoracic Society* 2(4): 373–385.

Owen, C. A.

2008 Role for proteinases in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease* 3(2): 253–268.

Pan, Zhong-Zong, Lisa Parkyn, Anuradha Ray, and Prabir Ray

2000 Inducible Lung-specific Expression of RANTES: Preferential Recruitment of Neutrophils. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 279(4): L658–L666.

Parks, W C, and S B Deak

1990 Tropoelastin Heterogeneity: Implications for Protein Function and Disease. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2(5): 399–406.

Partridge, S M, D F Elsdon, J Thomas, et al.

1964 Biosynthesis of the Desmosine and Isodesmosine Cross-bridges in Elastin. *The Biochemical Journal* 93(3): 30C–33C.

Partridge, S. M., H. F. Davis, and G. S. Adair

1955 The Chemistry of Connective Tissues. 2. Soluble Proteins Derived from Partial Hydrolysis of Elastin. *Biochemical Journal* 61(1): 11.

Patel, Dhaval, Susan E. Vandromme, Michael E. Reid, and Lakeshia J. Taite

2012 Synergistic Activity of $\alpha\beta 3$ Integrins and the Elastin Binding Protein Enhance Cell-Matrix Interactions on Bioactive Hydrogel Surfaces. *Biomacromolecules* 13(5): 1420–1428.

Pena, Ana-Maria, Aurélie Fabre, Delphine Débarre, et al.

2007 Three-dimensional Investigation and Scoring of Extracellular Matrix Remodeling During Lung Fibrosis Using Multiphoton Microscopy. *Microscopy Research and Technique* 70(2): 162–170.

Petersen, E., F. Wågberg, and K.-A. Ängquist

2002 Serum Concentrations of Elastin-derived Peptides in Patients with Specific Manifestations of Atherosclerotic Disease. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery* 24(5): 440–444.

Péterszegi, G, A M Robert, and L Robert

1996 Presence of the Elastin-laminin Receptor on Human Activated Lymphocytes. *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences. Série III, Sciences de La Vie* 319(9): 799–803.

Pinto-Plata, Victor M, Guy Livnat, Mirle Girish, et al.

2007 Systemic Cytokines, Clinical and Physiological Changes in Patients Hospitalized for Exacerbation of COPD. *Chest* 131(1): 37–43.

- Piontkivska, Helen, Yi Zhang, Eric D. Green, and Laura Elnitski
2004 Multi-species Sequence Comparison Reveals Dynamic Evolution of the Elastin Gene That Has Involved Purifying Selection and Lineage-specific Insertions/deletions. *BMC Genomics* 5(1): 31.
- Pocza, Peter, Helga Süli-Vargha, Zsuzsa Darvas, and Andras Falus
2007 Locally Generated VGVAPG and VAPG Elastin-derived Peptides Amplify Melanoma Invasion via the Galectin-3 Receptor. *International Journal of Cancer* 122(9): 1972–1980.
- Potier, M, L Michaud, J Tranchemontagne, and L Thauvette
1990 Structure of the Lysosomal Neuraminidase-beta-galactosidase-carboxypeptidase Multienzymic Complex. *The Biochemical Journal* 267(1): 197–202.
- Pottelberge, Geert R. Van, Pieter Mestdagh, Ken R. Bracke, et al.
2011 MicroRNA Expression in Induced Sputum of Smokers and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 183(7): 898–906.
- Prydz, Kristian, and Knut Tomas Dalen
2000 Synthesis and Sorting of Proteoglycans. *Journal of Cell Science* 113(2): 193–205.
- Rabe, Klaus F., Suzanne Hurd, Antonio Anzueto, et al.
2007 Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 176(6): 532–555.
- Rabinovich, Gabriel A., Linda G. Baum, Nicola Tinari, et al.
2002 Galectins and Their Ligands: Amplifiers, Silencers or Tuners of the Inflammatory Response? *Trends in Immunology* 23(6): 313–320.
- Ramachandran, G N, and A K Mitra
1976 An Explanation for the Rare Occurrence of Cis Peptide Units in Proteins and Polypeptides. *Journal of Molecular Biology* 107(1): 85–92.
- Reed, Charles C., and Renato V. Iozzo
2002 The Role of Decorin in Collagen Fibrillogenesis and Skin Homeostasis. *Glycoconjugate Journal* 19(4-5): 249–255.
- Retamales, Ivan, W. Mark Elliott, Bernard Meshi, et al.
2001 Amplification of Inflammation in Emphysema and Its Association with Latent Adenoviral Infection. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164(3): 469–473.
- Reynolds, Herbert Y
2002 Modulating Airway Defenses Against Microbes. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* 8(3): 154–165.
- Ricard-Blum, Sylvie, and Florence Ruggiero
2005 The Collagen Superfamily: From the Extracellular Matrix to the Cell Membrane. *Pathologie Biologie* 53(7): 430–442.

- Richens, Tiffany R., Derek J. Linderman, Sarah A. Horstmann, et al.
2009 Cigarette Smoke Impairs Clearance of Apoptotic Cells Through Oxidant-dependent Activation of RhoA. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 179(11): 1011–1021.
- Rodgers, U R, and Anthony S Weiss
2004 Integrin Alpha v Beta 3 Binds a Unique non-RGD Site Near the C-terminus of Human Tropoelastin. *Biochimie* 86(3): 173–178.
- Rodgers, Ursula R., and Anthony S. Weiss
2005 Cellular Interactions with Elastin. *Pathologie Biologie* 53(7): 390–398.
- Ross, Russell, and Paul Bornstein
1969 The Elastic Fiber I. The Separation and Partial Characterization of Its Macromolecular Components. *The Journal of Cell Biology* 40(2): 366–381.
- Rosso, Francesco, Antonio Giordano, Manlio Barbarisi, and Alfonso Barbarisi
2004 From Cell-ECM Interactions to Tissue Engineering. *Journal of Cellular Physiology* 199(2): 174–180.
- Rot, Antal, and Ulrich H. von Andrian
2004 Chemokines in Innate and Adaptive Host Defense : Basic Chemokines Grammar for Immune Cells. *Annual Review of Immunology* 22(1): 891–928.
- Roth, M.
2008 Pathogenesis of COPD. Part III. Inflammation in COPD [State of the Art Series. Chronic Obstructive Pulmonary Disease in High-and Low-income Countries. Edited by G. Marks and M. Chan-Yeung. Number 3 in the Series]. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 12(4): 375–380.
- Rozario, Tania, and Douglas W. DeSimone
2010 The Extracellular Matrix in Development and Morphogenesis: A Dynamic View. *Developmental Biology* 341(1): 126–140.
- Rucker, Robert B., and Michael A. Dubick
1984 Elastin Metabolism and Chemistry: Potential Roles in Lung Development and Structure. *Environmental Health Perspectives* 55: 179.
- Ryckaert, Jean-Paul, Giovanni Ciccotti, and Herman J.C Berendsen
1977 Numerical Integration of the Cartesian Equations of Motion of a System with Constraints: Molecular Dynamics of N-alkanes. *Journal of Computational Physics* 23(3): 327–341.
- Sali A, Blundell TL,
1993 Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints *J. Mol. Biol.* 234 : 779-815
- Sampsonas, Fotis, Kiriakos Karkoulas, Alexandros Kaparianos, and Kostas Spiropoulos
2006 Genetics of Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Beyond A1-antitrypsin Deficiency. *Current Medicinal Chemistry* 13(24): 2857–2873.

Sandford, A.J., T.D. Weir, and P.D. Paré

1997 Genetic Risk Factors for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *European Respiratory Journal* 10(6): 1380–1391.

Saravanan, C., F.-T. Liu, I. K. Gipson, and N. Panjwani

2009 Galectin-3 Promotes Lamellipodia Formation in Epithelial Cells by Interacting with Complex N-glycans on $\alpha 1$ Integrin. *Journal of Cell Science* 122(20): 3684–3693.

Saunders, Nicholas A., and Michael E. Grant

1984 Elastin Biosynthesis in Chick-embryo Arteries. Studies on the Intracellular Site of Synthesis of Tropoelastin. *Biochemical Journal* 221(2): 393.

Schlessinger, J, I Lax, and M Lemmon

1995 Regulation of Growth Factor Activation by Proteoglycans: What Is the Role of the Low Affinity Receptors? *Cell* 83(3): 357–360.

Schönherr, Elke, and Heinz-Jürgen Hausser

2000 Extracellular Matrix and Cytokines: a Functional Unit. *Clinical and Developmental Immunology* 7(2-4): 89–101.

Schriver, E E, J M Davidson, M C Sutcliffe, B B Swindell, and G R Bernard

1992 Comparison of Elastin Peptide Concentrations in Body Fluids from Healthy Volunteers, Smokers, and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The American Review of Respiratory Disease* 145(4 Pt 1): 762–766.

Seemungal, Terence, Rhian Harper-Owen, Angshu Bhowmik, et al.

2001 Respiratory Viruses, Symptoms, and Inflammatory Markers in Acute Exacerbations and Stable Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 164(9): 1618–1623.

Senior, Robert M., Gail L. Griffin, Robert P. Mecham, et al.

1984 Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly, a Repeating Peptide in Elastin, Is Chemotactic for Fibroblasts and Monocytes. *The Journal of Cell Biology* 99(3): 870–874.

Senior, ROBERT M., GAIL L. Griffin, and ROBERT P. Mecham

1980 Chemotactic Activity of Elastin-derived Peptides. *Journal of Clinical Investigation* 66(4): 859.

Serbina, N. V., and J. L. Flynn

2001 CD8+ T Cells Participate in the Memory Immune Response to Mycobacterium Tuberculosis. *Infection and Immunity* 69(7): 4320–4328.

Sethi, J M, and C L Rochester

2000 Smoking and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clinics in Chest Medicine* 21(1): 67–86, viii.

Shapiro, S D

1994 Elastolytic Metalloproteinases Produced by Human Mononuclear Phagocytes. Potential Roles in Destructive Lung Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 150(6 Pt 2): S160–164.

Shapiro, Steven D., Nir M. Goldstein, A. McGarry Houghton, et al.

2003 Neutrophil Elastase Contributes to Cigarette Smoke-induced Emphysema in Mice. *The American Journal of Pathology* 163(6): 2329–2335.

Sharma, S, and M Bose

2001 Role of Cytokines in Immune Response to Pulmonary Tuberculosis. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology / Launched by the Allergy and Immunology Society of Thailand* 19(3): 213–219.

Shifren, A.

2006 The Stumbling Block in Lung Repair of Emphysema: Elastic Fiber Assembly. *Proceedings of the American Thoracic Society* 3(5): 428–433.

Sibille, Y, and H Y Reynolds

1990 Macrophages and Polymorphonuclear Neutrophils in Lung Defense and Injury. *The American Review of Respiratory Disease* 141(2): 471–501.

Smith, S M, and H M Dockrell

2000 Role of CD8 T Cells in Mycobacterial Infections. *Immunology and Cell Biology* 78(4): 325–333.

Sorokin, Lydia

2010 The Impact of the Extracellular Matrix on Inflammation. *Nature Reviews Immunology* 10(10): 712–723.

Steinbach, Peter J., and Bernard R. Brooks

1994 New Spherical-cutoff Methods for Long-range Forces in Macromolecular Simulation. *Journal of Computational Chemistry* 15(7): 667–683.

Stenger, S

2001 Cytolytic T Cells in the Immune Response to Mycobacterium Tuberculosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 33(7): 483–487.

Stone, P J, C Franzblau, and H M Kagan

1982 Proteolysis of Insoluble Elastin. *Methods in Enzymology* 82 Pt A: 588–605.

Szabó, Zoltán, Simona A. Levi-Minzi, Angela M. Christiano, et al.

1999 Sequential Loss of Two Neighboring Exons of the Tropoelastin Gene During Primate Evolution. *Journal of Molecular Evolution* 49(5): 664–671.

Taggart, Clifford C., Catherine M. Greene, Tomas P. Carroll, Shane J. O'Neill, and Noel G. McElvaney

2005 Elastolytic Proteases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 171(10):

1070–1076.

Tamburro, Antonio M., Brigida Bochicchio, and Antonietta Pepe
2003 Dissection of Human Tropoelastin: Exon-By-Exon Chemical Synthesis and Related Conformational Studies †. *Biochemistry* 42(45): 13347–13362.

Taraseviciene-Stewart, Laimute, Robertas Scerbavicius, Kang-Hyeon Choe, et al.
2005 An Animal Model of Autoimmune Emphysema. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 171(7): 734–742.

Tarran, Robert
2004 Regulation of Airway Surface Liquid Volume and Mucus Transport by Active Ion Transport. *Proceedings of the American Thoracic Society* 1(1): 42–46.

Taylor, A. E., T. K. Finney-Hayward, J. K. Quint, et al.
2009 Defective Macrophage Phagocytosis of Bacteria in COPD. *European Respiratory Journal* 35(5): 1039–1047.

Thornton, D. J., I. Carlstedt, M. Howard, et al.
1996 Respiratory Mucins: Identification of Core Proteins and Glycoforms. *Biochemical Journal* 316(Pt 3): 967.

De Torres, Juan P, Victor Pinto-Plata, Ciro Casanova, et al.
2008 C-reactive Protein Levels and Survival in Patients with Moderate to Very Severe COPD. *Chest* 133(6): 1336–1343.

Travis, S M, B A Conway, J Zabner, et al.
1999 Activity of Abundant Antimicrobials of the Human Airway. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 20(5): 872–879.

Tsoumakidou, Maria, Ingel K. Demedts, Guy G. Brusselle, and Peter K. Jeffery
2008 Dendritic Cells in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 177(11): 1180–1186.

Uitto, J, A M Christiano, V M Kähäri, M M Bashir, and J Rosenbloom
1991 Molecular Biology and Pathology of Human Elastin. *Biochemical Society Transactions* 19(4): 824–829.

Umeda, H., K. Kawamorita, and K. Suyama
2001 High-performance Liquid Chromatographic Quantification of Allylsine as Bis-p-cresol Derivative in Elastin. *Amino Acids* 20(2): 187–199.

Vandivier, R. William, Peter M. Henson, and Ivor S. Douglas
2006 Burying the Dead The Impact of Failed Apoptotic Cell Removal (Efferocytosis) on Chronic Inflammatory Lung Disease. *CHEST Journal* 129(6): 1673–1682.

Varga, Z, M P Jacob, L Robert, and T Fülöp Jr

1989 Identification and Signal Transduction Mechanism of Elastin Peptide Receptor in Human Leukocytes. *FEBS Letters* 258(1): 5–8.

Verlet, Loup

1967 Computer “Experiments” on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Review* 159(1): 98–103.

Villena, Joan, and Enrique Brandan

2004 Dermatan Sulfate Exerts an Enhanced Growth Factor Response on Skeletal Muscle Satellite Cell Proliferation and Migration. *Journal of Cellular Physiology* 198(2): 169–178.

Vinall, L E, J C Fowler, A L Jones, et al.

2000 Polymorphism of Human Mucin Genes in Chest Disease: Possible Significance of MUC2. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 23(5): 678–686.

Vrhovski, Bernadette, Sacha Jensen, and Anthony S. Weiss

1997 Coacervation Characteristics of Recombinant Human Tropoelastin. *European Journal of Biochemistry* 250(1): 92–98.

Vrhovski, Bernadette, and Anthony S. Weiss

1998 Biochemistry of Tropoelastin. *European Journal of Biochemistry* 258(1): 1–18.

Wagenseil, J. E., and R. P. Mecham

2009 Vascular Extracellular Matrix and Arterial Mechanics. *Physiological Reviews* 89(3): 957–989.

Wanderer, Alan A.

2011 Hypoxia and Inflammation. *N Eng J Med* 364: 1976.

Ward, P A

1997 Recruitment of Inflammatory Cells into Lung: Roles of Cytokines, Adhesion Molecules, and Complement. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 129(4): 400–404.

Wei, S M, E Katona, J Facht, et al.

1998 Epitope Specificity of Monoclonal and Polyclonal Antibodies to Human Elastin. *International Archives of Allergy and Immunology* 115(1): 33–41.

Werb, Z, M J Banda, J H McKerrow, and R A Sandhaus

1982 Elastases and Elastin Degradation. *The Journal of Investigative Dermatology* 79 Suppl 1: 154s–159s.

De Wever, Olivier, Pieter Demetter, Marc Mareel, and Marc Bracke

2008 Stromal Myofibroblasts Are Drivers of Invasive Cancer Growth. *International Journal of Cancer* 123(10): 2229–2238.

Wiernicki, I., M. Cnotliwy, I. Baranowska-Bosiacka, et al.

2008 Elastin Degradation Within the Abdominal Aortic Aneurysm Wall - Relationship Between Intramural pH and Adjacent Thrombus Formation. *European Journal of Clinical Investigation* 38(12): 883–887.

Wise, Steven G., and Anthony S. Weiss

2009 Tropoelastin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41(3): 494–497.

Wolfe, B. Leslie, Celeste B. Rich, H. Danana Goud, et al.

1993 Insulin-like Growth factor-I Regulates Transcription of the Elastin Gene. *Journal of Biological Chemistry* 268(17): 12418–12426.

Xing, Z, M Jordana, H Kirpalani, et al.

1994 Cytokine Expression by Neutrophils and Macrophages in Vivo: Endotoxin Induces Tumor Necrosis Factor-alpha, Macrophage Inflammatory Protein-2, Interleukin-1 Beta, and Interleukin-6 but Not RANTES or Transforming Growth Factor-beta 1 mRNA Expression in Acute Lung Inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 10(2): 148–153.

Yeo, Giselle C., Fred W. Keeley, and Anthony S. Weiss

2011 Coacervation of Tropoelastin. *Advances in Colloid and Interface Science* 167(1-2): 94–103.

Yoon, J. H., and J. Halper

2005 Tendon Proteoglycans: Biochemistry and Function. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 5(1): 22–34.

Zahm, J M, D Pierrot, S Vaquez-Girod, et al.

1989 The Role of Mucus Sol Phase in Clearance by Simulated Cough. *Biorheology* 26(4): 747–752.

PARTIE 7 : Contributions scientifiques complémentaires

Rapid Method of Quantification of Tight-Junction Organization Using Image Analysis

Christine Terryn,^{1*} Mehdi Sellami,² Caroline Fichel,³ Marie-Danielle Diebold,³ Sophie Gangloff,⁴ Richard Le Naour,² Myriam Polette,^{5,6} Jean-Marie Zahm^{5,6}

¹Plateforme Imagerie Cellulaire et Tissulaire, Université de Reims Champagne Ardenne, Reims, France

²EA 4683, Université de Reims Champagne Ardenne, Reims, France

³Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Robert Debré, Reims, F-51092, France

⁴EA 4691, Université de Reims Champagne Ardenne, Reims, France

⁵INSERM UMRS 903, Université de Reims Champagne Ardenne, Reims, France

⁶CHU Reims, Hôpital Maison Blanche, Reims, F-51092, France

Received 3 July 2012; Revision Received 30 August 2012; Accepted 8 November 2012

*Correspondence to: Christine Terryn, Plateforme Imagerie Cellulaire et Tissulaire 51 rue Cognacq-Jay, 51100 REIMS, France

Email: christine.terr@univ-reims.fr

Published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

DOI: 10.1002/cyto.a.22239

© 2012 International Society for Advancement of Cytometry

• Abstract

The spatial organization of proteins in a cell population or in tissues is an important parameter to study the functionality of biological specimens. In this article, we have focused on tight junctions which form network-like features in immunofluorescence microscopy images. Usually, the organization or disorganization of tight junctions is noticed qualitatively. The aim of this article is to present a simple method to quantify the organization level of tight junction network using image analysis with a dedicated macro developed with Image J software. The method has been validated with simulated images displaying regular decrease of network organization. Then, the macro has been applied to immunofluorescence microscopy images of cells in culture and of tissue sections. © 2012 International Society for Advancement of Cytometry

• Key terms

tight junction organization; image analysis; fluorescence microscopy; quantification

Today, research in the field of animal cells mainly focuses on biochemical aspects such as gene expression and signal transduction. However, it is also of interest to develop methods to study the spatial organization of proteins at a single cell level or at a cell population level. Among the proteins implemented by cells, those involved in tight junctions, particularly in epithelial cells, play a key role in the maintenance of the protective functions of epithelia. Tight junctions, or zonula occludens, are the closely associated areas of two cells whose membranes join together forming a virtually impermeable barrier to fluid. In electron microscopy ultrathin-section, tight junctions are visualized as a zone in which adjacent plasma membranes are closely apposed, and circumscribe the cell like a belt (1). Just beneath the plasma membrane of tight junctions, PDZ domain-containing cytoplasmic proteins directly interact with tight junction-associated integral membrane proteins and form cytoplasmic plaques (2). Three structurally related proteins, zonula occludens-1 (ZO-1), ZO-2, and ZO-3, are included in these cytoplasmic plaques. ZO-1 was the first reported tight junction-associated molecule. Because tight junctions are very dynamic structures that assemble, grow, reorganize, and disassemble during physiological or pathological events, immunolocalization of ZO-1 protein is frequently used to assess their spatial distribution. In a given cell, this protein exhibits a continuous distribution along the contacts with neighboring cells, indicating the formation of a junctional belt.

The association of the belt coming from neighboring cells forms a typical network that can be easily visualized by conventional fluorescence microscopy. This network appears progressively during epithelial differentiation or can be disrupted in the presence of external agents that may alter the epithelial barrier. It is, therefore, of interest to determine quantitative parameters to characterize this network. Quantitative analysis of protein network in cells has been mainly applied to the study of the

TECHNICAL NOTE

cytoskeleton dynamics (3–5). Computerized image analysis coupled to the determination of different parameters has also been suggested for studying and quantifying the combined process of tumor invasion and vascular network formed during angiogenesis (6). The aim of this work has been to develop a simple method to quantify the variations in tight junction protein spatial organization on immunofluorescent images recorded with a conventional microscope on cells in culture or on tissue sections.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Bacterial Supernatant

Bacterial supernatant was prepared by growing *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1 strain) in Trypticase Soy Broth (TSB) medium to stationary phase at 37°C for 48 h under mild agita-

tion. Supernatants of 5×10^9 colony-forming units (cfu/ml) were obtained by centrifugation at 3,000 rpm for 15 min at 4°C and filtration through a 0.2- μ m filter (Pall Gelman Science, Ann Arbor, MI). The bacterial supernatant was used after dilution (1:10) in RPMI 1640 supplemented culture medium.

Culture of Human Airway Epithelial Cells

The use of human tissues was authorized by the bioethical law 94–654 of the Public Health Code of France, with a written consent from the patients. The human airway tissue samples used here were nasal polyps obtained from patients undergoing nasal polypectomy. The tissue was then digested with 0.1% pronase E (Sigma Aldrich, St. Quentin Fallavier, France) for 12 h at 4°C, and the dissociated epithelial cells were seeded on glass coverslips coated with type I collagen (2.5 mg/ml in 0.016 mM acetic acid). The cells were grown to confluence in RPMI 1640 supplemented culture medium and incubated for 30 min with 10% PAO1 supernatant. We analyzed the protective effect of salmeterol on airway epithelial barrier junction by preincubating the airway cells with salmeterol (2×10^{-7} M) for 16 h and analyzing the ZO1 expression after incubation with PAO1 supernatant (30 min). For immunolocalization of ZO1, cells were fixed in methanol for 10 min at -20°C .

Mouse Model of Lung Injury

Animal studies were conducted according to protocols approved by the Institutional Ethical Committee for animal experiments from our institute. C57BL/6 mice (Harlan Sprague Dawley Inc., Gannat, France) received an intra-tracheal injection of a single dose of porcine pancreatic elastase (PPE) or PBS to study acute lung injury biomarkers. Mice were killed at 7 days postinjection. Frozen tissue was used for immunofluorescent labeling of ZO-1. Cryosections were used for immunolocalization of ZO-1.

Immunolocalization of ZO-1

Cryofixed cell cultures or cryosections of lung tissues were saturated for 30 min with 3% bovine serum albumin in

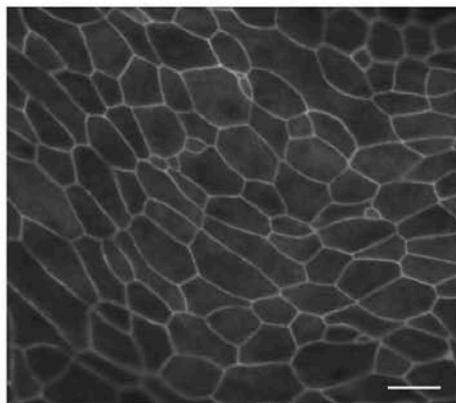


Figure 1. Fluorescence microscopy image of tight junction immunolabeling in airway epithelial cells in culture. (Scale bar: 20 μm).

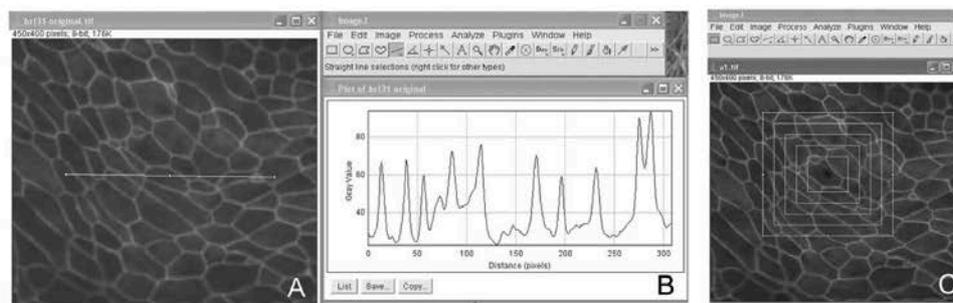


Figure 2. Image processing using ImageJ: the first step consists in plotting the gray level profile along a line drawn by the user (A) to determine the threshold value of the background (B). Then, the user draws, through the network, a polygon which is then successively enlarged with a step chosen by the user (C).

TECHNICAL NOTE

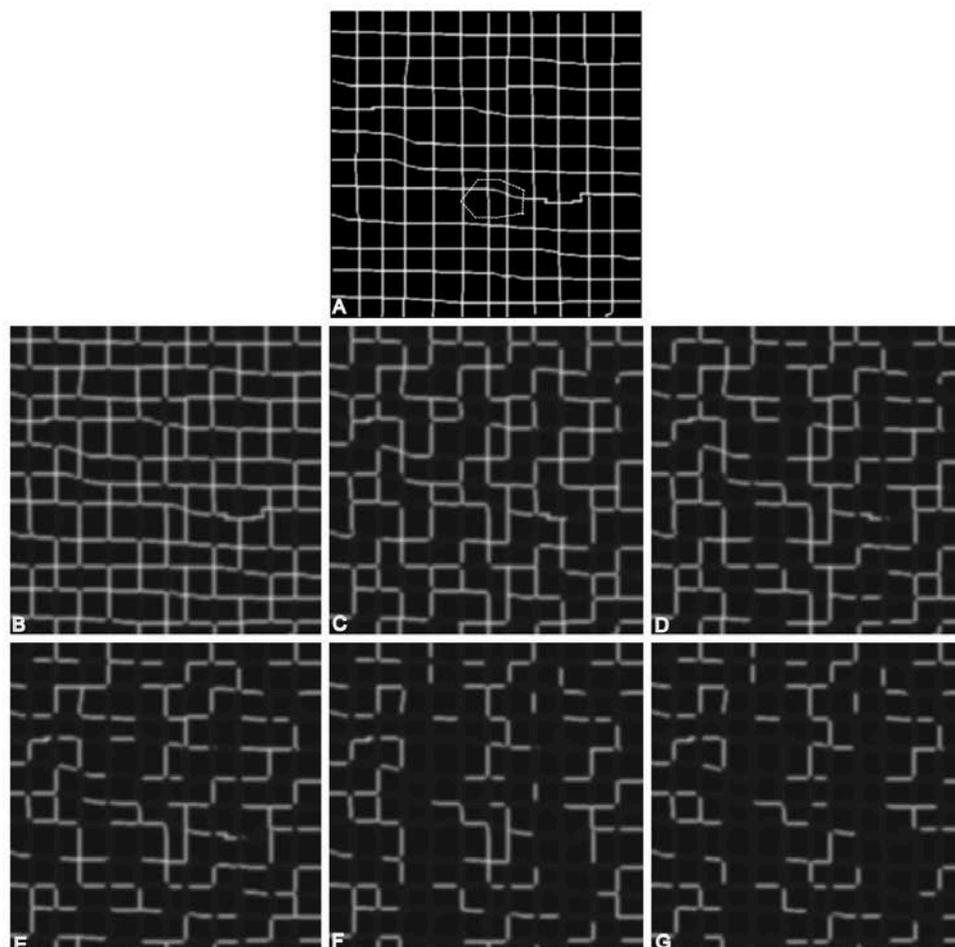


Figure 3. Simulated network used to test the software; image A shows the first polygon on the entire network. Images B to G show successively destroyed networks from A.

PBS. Samples were successively (after intermediate washes in PBS) incubated for 1 h with a mouse monoclonal antibody to ZO-1 (1:10; Zymed), a biotinylated-sheep anti-mouse antibody (1:50; Amersham, Aylesbury, UK), and an Alexa Fluor 488-conjugated streptavidin (1:100; Molecular Probes). After incubation with the different antibodies, samples were counterstained with Harris hematoxylin solution for 10 s, then mounted with Aquapolymount antifading solution (Polysciences, Warrington, PA) onto glass slides. Slides were observed under an Axiophot fluorescence microscope (Zeiss) at $\times 40$ magnification.

Image Analysis

To quantify the tight junction organization or disorganization, we propose a simple method of image processing using ImageJ software (7). Tight junction images of a normal epithelium in fluorescence microscopy show a regular network with continuous peaks of maximum intensity coupled with low intensity background (Fig. 1). The first step of image processing consists in plotting the gray level profile along a line drawn by the user as shown in Figure 2A. From this profile, the user determines a threshold value to discard any background (Fig. 2B). This user operation is required even if a top-hat

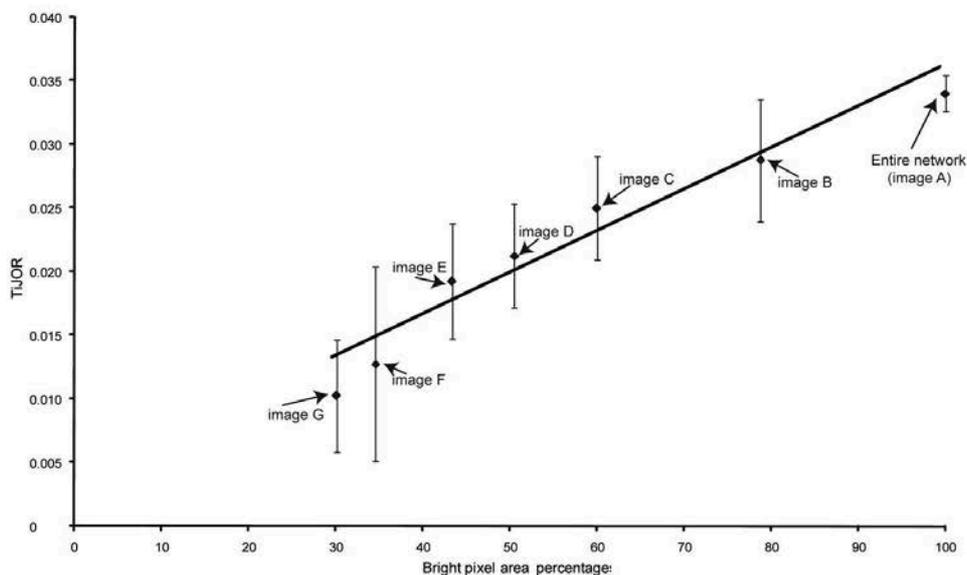


Figure 4. TjJOR versus bright pixel area percentages calculated on simulated networks. These two parameters are calculated using the first polygon defined in Figure 3 which is extended three times using enlarged step of 33 pixels. The mean and standard deviation are determined over these four polygons.

segmentation is applied on image before analysis. Indeed, although the images show clear network features, a weak background is always detected even after top-hat segmentation (data not shown). Then, the user defines a polygon which passes through the network. This polygon is then extended to successive larger polygons according to a step chosen by the user (Fig. 2C) (the polygon perimeter lengths depart from a few hundred to a few thousand pixels according to image size). Then, the software counts the number of intersections between the polygons and the intensity peaks corresponding to the protein network and calculates the ratio of the number of intensity peaks to the polygon perimeter calculated in pixels. This ratio is defined as the Tight Junction Organization Rate (TjJOR). To be independent of pixel size in analyzed images, all data (step length and polygon perimeter) are saved in pixels for calculations in this method. Therefore, this ImageJ macro can be used on images with different pixel sizes.

To validate the analysis process, we used simulated images of a network which is progressively degraded according well-known characteristics: 20 to 70% of the network features are progressively withdrawn as shown in Figure 3.

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed with Statview (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). Data are expressed as

median and were compared by using the nonparametric Mann and Whitney test. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Our method was first applied to simulated images displaying a regular network and a progressive disappearance of this network. For each image, TjJOR was calculated over four polygons with enlarged step of 33 pixels. Then, images were thresholded and the percentage of pixel area of the network was calculated. Results presented in Figure 4 show the relationship between TjJOR and the network pixel area percentages. A high and significant correlation coefficient ($r = 0.95$, $P < 0.05$) was observed between TjJOR and the network density. To go further in the validation of the technique, we used the image displayed in Figure 1 to verify the influence of the step width used to progressively extend the successive polygons. As shown in Figure 5A, we observed that TjJOR remained constant whatever the width of the step between the successive polygons. The geometry of the polygons also did not modify the value of TjJOR as demonstrated in Figure 5B. These data confirm the relevance of the method that we used for quantifying the network density.

The method was then applied to biological samples. We have previously investigated the protective effect of salmeterol,

TECHNICAL NOTE

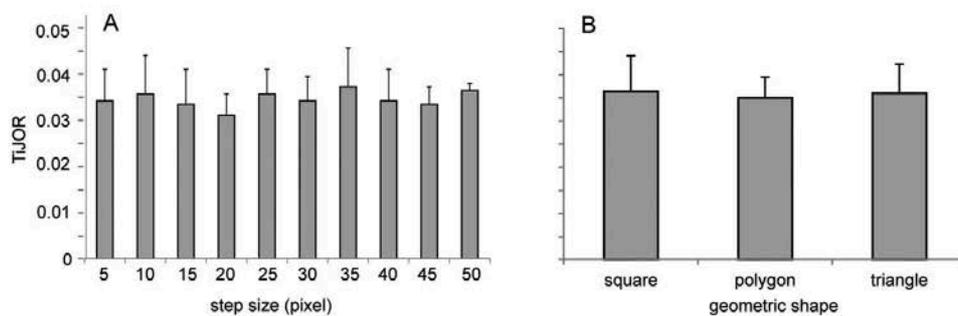


Figure 5. TjJOR versus increasing step size between two polygons (A) and versus geometric shape of the polygon (B). TjJOR is calculated on the image represented in Figure 1.

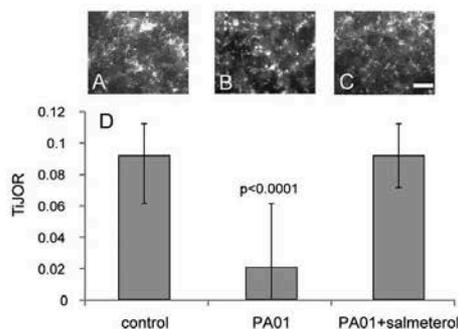


Figure 6. Effect of PAO1 supernatant on TjJOR. Immunolabeling of ZO-1 in (A) control airway epithelial cells. (B) Airway epithelial cells incubated with PAO1 supernatant. (C) Airway epithelial cells preincubated with salmeterol. Measurement of TjJOR according to the three experimental conditions (D). (Scale bar: 20 μ m)

a long-acting β 2-adrenergic agonist, on *P. aeruginosa* (PAO1) supernatant-induced alteration of the epithelial junctional barrier (8). When airway epithelial cell cultures were exposed to PAO1 supernatants, we demonstrated by Western Blotting that apical expression of ZO-1 protein was maintained in salmeterol-pretreated cell cultures, whereas it disappeared after PAO1 supernatant cell exposure in cultures not pretreated with salmeterol. The immunofluorescence images of ZO-1 obtained in this previous study were used to apply the present method of network quantification. As shown in Figure 6A in control cell cultures, a homogeneous immunolabeling of ZO-1 was observed, whereas exposition of cells to PAO1 supernatant decreased the expression of ZO-1 (Fig. 6B). Pretreatment of cells with salmeterol prevented decrease of ZO-1 labeling induced by PAO1 supernatant (Fig. 6C). The quantitative data obtained from these images presented in Figure 6D, demonstrate a significant decrease of TjJOR in cells treated with

PAO1 supernatant and the annulation of this decrease when cells were pretreated with salmeterol.

We further tested our method on lung tissue sections of mice having received intrapulmonary elastase or PBS. In PBS-injected mice, ZO-1 adopts a uniform distribution in lung tissues (Fig. 7A) whereas a decreased and discontinuous ZO-1 labeling expression was observed in elastase-injected mice (Fig. 7B). The data obtained by measurement of TjJOR presented in Figure 7C, show a significant decrease of TjJOR correlated with the elastase-induced ZO-1 disorganization.

In comparison with another robust fractal method like the box count method used by "Fractal dimension and lacunarity" plugin of ImageJ, our TjJOR method is slightly less accurate and slightly faster. However, the main advantage of our method is that it can be easily used by biologists without any specific knowledge of image analysis techniques, without

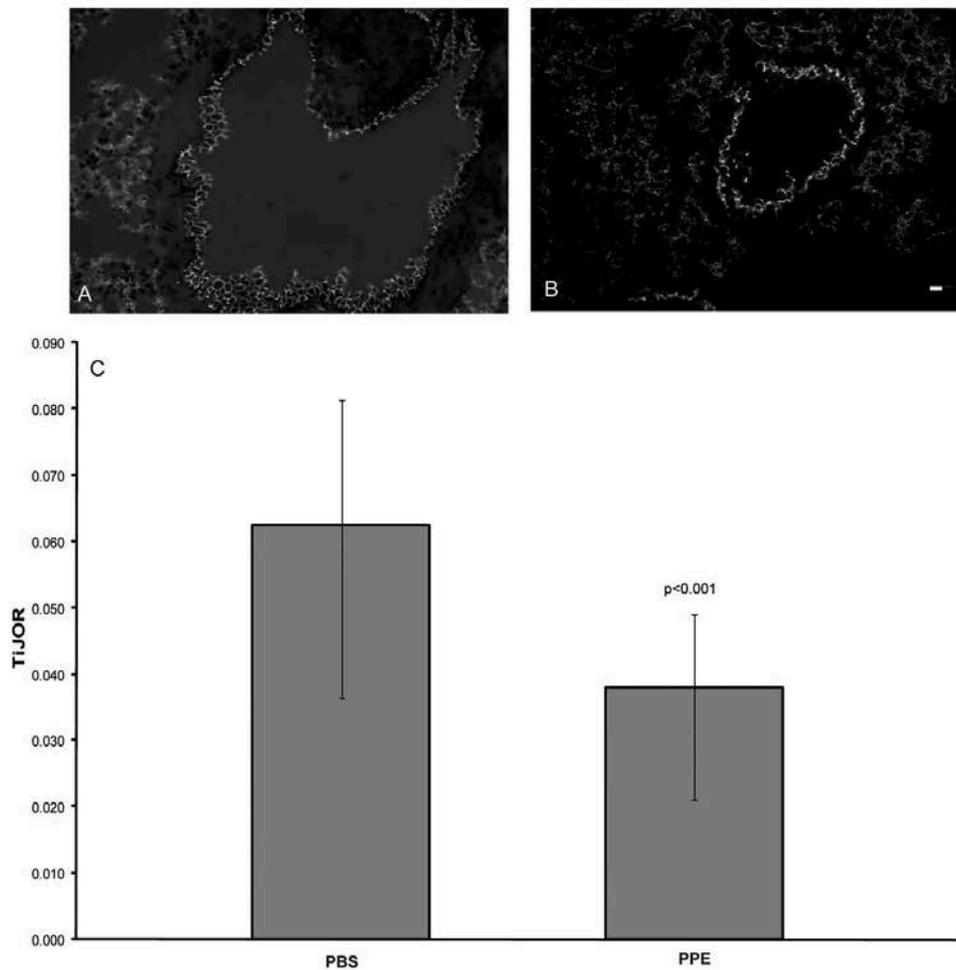


Figure 7. Effect of elastase injection on TiJOR. Immunolabeling of ZO1 on lung cryosections of C57BL/6 control mice (A). Cryosections of elastase treated C57BL/6 mice (B). Measurement of TiJOR according to the two experimental conditions (C). (Scale bar: 20 μ m)

image pretreatment, leading to a rapid learning and user-friendly method.

CONCLUSIONS

This study introduces a very simple but powerful method for quantifying the organization of a network-like immunolabeling using ImageJ software. The quantification process that we propose is mainly applicable to cell cultures or tissue exhibiting membranous proteins present in tight junctions or

adherent junctions. Our method is particularly suitable to analyze the effect of agents able to alter or to protect protein networks.

LITERATURE CITED

1. Furuse M. Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010;2:a002907. Review.
2. González-Mariscal L, Betanzos A, Avila-Flores A. MAGUK proteins: Structure and role in the tight junction. *Semin Cell Dev Biol* 2000;11: 315–324.

TECHNICAL NOTE

3. Beil M, Braxmeier H, Fleischer F, Schmidt V, Walther P. Quantitative analysis of keratin filament networks in scanning electron microscopy images of cancer cells. *J Microsc* 2005;220 (Pt 2):84–95.
4. Fortet S, Vassy J, Beil M, Millot G, Hebbache A, Rigaut JF, Schoëvaert D. Quantitative analysis of cytokeratin network topology in the MCF7 cell line. *Cytometry* 1999;35:203–213.
5. Weichsel J, Herold N, Lehmann MJ, Kräusslich HG, Schwarz US. A quantitative measure for alterations in the actin cytoskeleton investigated with automated high-throughput microscopy. *Cytometry A* 2010;77A:53–63.
6. Blacher S, Jost M, Melen-Lamalle L, Land LR, Romet J, Foidart JM, Noël A. Quantification of in vivo tumor invasion and vascularization by computerized image analysis. *Microvasc Res* 2008;75:169–78.
7. Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ. Image Processing with ImageJ. *Biophoton Int* 2004;11:36–42.
8. Coraux C, Kilezky C, Folette M, Hinnrasky J, Zahm JM, Devillier F, De Bentzmann S, Fuchelle E. Airway epithelial integrity is protected by a long-acting beta2-adrenergic receptor agonist. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004;30:605–612.

Peptides d'élastine et inflammation pulmonaire au cours de la Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO)

RESUME

La Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (BPCO) est une pathologie pulmonaire complexe entraînant une diminution progressive et irréversible des capacités respiratoires. L'emphysème est la composante majoritaire de la BPCO. Une importante réponse inflammatoire chronique est associée à la BPCO et implique à la fois les cellules de l'immunité innée, comme les macrophages et les polynucléaires neutrophiles (PN), et les cellules de l'immunité adaptative. La BPCO est également caractérisée par une destruction importante du tissu pulmonaire qui est associée à une dégradation de l'élastine et du collagène, deux protéines essentielles de la matrice extra-cellulaire (MEC). Cette dégradation génère des peptides doués de nombreuses activités biologiques. Le travail de thèse présenté ici nous a permis de montrer que l'injection intra-trachéale du peptide VGVAPG, une séquence active des peptides d'élastine (PE) induit un emphysème chez la souris, emphysème caractérisé par une forte infiltration des macrophages et des PN dans les lavages bronchoalvéolaires (LBA) et dans le parenchyme pulmonaire et par une destruction de la MEC au niveau du tissu pulmonaire. L'effet des PE s'exerce par le biais du complexe récepteur à l'élastine (CRE) et est déclenché par l'interaction des PE avec la sous-unité EBP du complexe. Nous avons montré, dans un travail précédent, que la spécificité de l'interaction entre l'EBP et les PE est associée à la présence du motif GXXP dans les peptides et à l'adoption d'une conformation en coude β de type VIII par le peptide. Sur la base de ces résultats, nous avons effectué, à partir du peptide VGVAPG, des mutations systématiques des résidus centraux de GXXP afin de déterminer les peptides les plus favorablement repliés en coude beta de type VIII et nous avons sélectionné les meilleurs candidats pour la fixation à l'EBP. Nous avons focalisé notre attention sur les peptides interagissant avec l'EBP et qui montraient des effets biologiques modérés. La possibilité d'utiliser de tels peptides comme des antagonistes des effets du peptide VGVAPG a été évaluée *in vitro* et *in vivo*.

SUMMARY:

The Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) is a complex lung disease causing a progressive and irreversible decrease in respiratory capacity. Emphysema is the major component of COPD. An important chronic inflammatory response is associated with COPD and involves both cells of innate immunity, such as macrophages and neutrophils (PN), and the cells of the adaptive immunity. COPD is characterized by extensive destruction of lung tissue that is associated with degradation of elastin and collagen, two essential proteins of the extracellular matrix (ECM). This degradation generates peptides endowed numerous biological activities. The thesis presented here has allowed us to show that the intratracheal injection of peptide VGVAPG, an active sequence of elastin peptides (PE)-induced emphysema in mice, emphysema characterized by a strong infiltration of macrophages and PN in the bronchoalveolar lavage (BAL) and in the lung parenchyma and the destruction of the ECM in the lung tissue. The effect of PE is exercised through the elastin receptor complex (CRE) and is triggered by the interaction of PE with subunit EBP complex. We have shown in previous work that the specificity of the interaction between EBP and PE is associated with the presence of GXXP motif in peptides and the adoption of a conformation type VIII β turn by peptide. Based on these results, we have made, from the peptide VGVAPG, systematic changes of the central residues GXXP to identify peptides most favorably bent type VIII β turn and we selected the best candidates for fixing to EBP. We focused our attention on the peptides interact with the EBP, which showed moderate biological effects. The possibility of using such peptides as antagonists of the effects of peptide VGVAPG was evaluated *in vitro* and *in vivo*.

MOTS-CLES

Peptides d'élastine, Inflammation pulmonaire, Modèle murin, Modélisation moléculaire, Peptides antagoniste