

**UNIVERSITE DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE
U.F.R DE MEDECINE**

**DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE REIMS
CHAMPAGNE-ARDENNE**

Discipline : Immunologie

Présenté par

Rym BENABID

**Rôle de l'élastase du neutrophile dans les
infections pulmonaires à *Pseudomonas
aeruginosa***

Thèse soutenue publiquement le 30 Mars 2009

Devant le jury :

M. le Professeur Francis GAUTHIER (Tours)	Rapporteur
M. le Docteur Lhousseine TOUQUI (Paris)	Rapporteur
M. le Docteur Jean-Claude SIRARD (Lille)	Examineur
Mme. le Professeur Sophie GANGLOFF (Reims)	Examineur
M. le Docteur Azzaq BELAAOUAJ (Reims)	Directeur de Thèse

À la mémoire de mon grand-père Abderrahmane...

SOMMAIRE

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES	6
TABLEAUX	6
FIGURES	6
LISTE DES ABREVIATIONS	8
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS LIEES A L'ETUDE	10
<i>INTRODUCTION</i>	13
CHAPITRE 1 : PSEUDOMONAS AERUGINOSA	14
I- Caractéristiques générales :	15
I-1- Description :	15
I-2- Caractères structuraux :	15
I-3- Habitat et distribution environnementale :	17
II- Pathogénie de <i>P. aeruginosa</i> :	17
II-1- Facteurs de virulence membranaire :	18
II-2- Facteurs de virulence sécrétés via le système de sécrétion de type III :	22
II-3- Autres facteurs de virulence sécrétés :	24
II-3-1 Les protéases :	24
II-3-1-1 Les métalloprotéases :	24
a- L'élastase (Pseudolysine/Las B) :	24
b- Las A (staphylolysine) :	24
c- La protéase alcaline (Aeruginolysine) :	25
II-3-1-2 les sérine-protéase :	25
a- La protéase IV (Arginyl peptidase):	25
b- Las D:	25
II-3-2 La leucocidine :	25
II-3-3 Les phospholipases et les lecithinases :	25
II-4- Régulation de l'expression des facteurs de virulence ou « Quorum sensing » :	26
III- Infections à <i>P. aeruginosa</i> :	26
III-1 Infections chroniques :	27
III-2 Infections aiguës :	29
IV- Résistance de <i>P. aeruginosa</i> aux antibiotiques :	29
V- Génome de <i>P. aeruginosa</i> :	30
CHAPITRE 2 : DEFENSE PULMONAIRE ANTIBACTERIENNE	32
I- Description générale de L'appareil respiratoire :	32
II- Mécanismes de défense immunitaire pulmonaire :	33

II-1- Défense innée de l'épithélium respiratoire :	33
II-1-1 Les molécules de la défense innée :	34
a- Lactoferrine :.....	34
b- Lysozyme :	34
c- SLPI / Elafine:	34
d- Défensines :	35
e- Cathélicidine LL-37 :	35
f- BPI (Bacterial Permeability-Increasing protein):	36
g- Lactoperoxydase (LPO) :.....	36
h- Collectines (les protéines du surfactant A et D) :	36
i- Phospholipase A2 (PLA2) :.....	37
II-1-2 Les macrophages alvéolaires :.....	37
II-1-3 Reconnaissance du pathogène:.....	37
II-1-4 Les récepteurs TLRs :	38
a- Récepteur TLR2 :.....	42
b- Récepteur TLR4 :	43
c- Récepteur TLR5 :.....	44
II-2- Défenses immunitaires acquises du poumon :	44
III- Réponse inflammatoire :.....	45
III-1- TNF- α :	46
III-1- MIP-2:.....	46
III-3- IL-6:.....	46
CHAPITRE 3 : LE POLYNUCLEAIRE NEUTROPHILE	48
I- Description :.....	48
II- Formation du neutrophile : hématopoïèse :	49
III- Granules du neutrophile :	50
IV- Fonctions du neutrophile en réponse à une infection :.....	51
IV-1 Migration du neutrophile au site inflammatoire :	51
IV-1-1 Roulement ou « rolling » :	52
IV-1-2 Adhésion ferme :.....	52
IV-1-3 Migration trans-endothéliale et franchissement de la membrane basale :.....	53
IV-2 Phagocytose, dégranulation et élimination du pathogène :	53
IV-2-1 Phagocytose :.....	53
IV-2-2 Dégranulation :	54
IV-2-3 Élimination du pathogène :	54
V- Elastase du neutrophile (NE) :.....	56
V-2 La protéine NE :	57
V-2-1 Synthèse et stockage:	57
V-2-2 Caractéristiques biochimiques:	58
V-3 Substrats de la NE :	59
V-4 Rôle antimicrobien de la NE :	61
V-5 Rôle de l'élastase dans la modulation de l'expression des cytokines et chimiokines :	62
V-6 Inhibiteurs physiologiques endogènes de la NE :.....	63
V-7 Effet délétère de la NE :	63
V-8 Mécanismes d'échappement de la NE aux inhibiteurs de protéases endogènes :.....	64
V-9 Génération de souris déficientes en l'élastase du neutrophile :	64
OBJETS.....	66
RECAPITULOS.....	69

ARTICLE 1.....	70
NEUTROPHIL ELASTASE MEDIATES INNATE HOST PROTECTION AGAINST <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>.....	70
L'ELASTASE DU NEUTROPHILE MEDIE LA PROTECTION DE L'HOTE CONTRE <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>	71
ARTICLE 2.....	84
NEUTROPHIL ELASTASE MEDIATES THE REGULATION OF CYTOKINES IN THE SETTING OF <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i> LUNG INFECTION.....	84
L'ELASTASE DU NEUTROPHILE MODULE L'EXPRESSION DES CYTOKINES DANS LE CAS DES INFECTIONS PULMONAIRES A <i>PSEUDOMONAS AERUGINOSA</i>.....	85
ABSTRACTS.....	124
REFERENCES.....	133

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

Tableaux

Tableau I : Taxinomie de <i>P. aeruginosa</i>	14
Tableau II : Ligands bactériens et leurs récepteurs épithéliaux	40
Tableau III : Substrats de la NE	60

Figures

Figure 1 : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> vue au microscope électronique	15
Figure 2 : Paroi de <i>P. aeruginosa</i>	16
Figure 3 : Facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	18
Figure 4 : Structure et assemblage d'un flagelle bactérien	19
Figure 5 : Structure du Pilus de type IV de <i>P. aeruginosa</i>	20
Figure 6 : Structure du LPS.....	21
Figure 7 : Structure tridimensionnelle d'OprF de <i>P. aeruginosa</i>	22
Figure 8 : Système de sécrétion de type III.....	23
Figure 9 : Infections à <i>P. aeruginosa</i>	27
Figure 10 : Représentation circulaire du génome de <i>P. aeruginosa</i>	30
Figure 11 : Appareil respiratoire humain	32
Figure 12 : Reconnaissance du pathogène par les cellules épithéliales	38
Figure 13 : Comparaison de la structure des récepteurs TLR avec l'IL-1R	39
Figure 14 : Localisation cellulaire des TLRs	40
Figure 15 : Reconnaissance des facteurs de virulence membranaires	41
Figure 16 : Voie de signalisation des TLRs	42

Figure 17 : Microscopie électronique d'un neutrophile humain	48
Figure 18 : Caractéristiques morphologiques du développement du neutrophile	49
Figure 19 : Contenu des granules du neutrophile.....	50
Figure 20 : Migration des neutrophiles	51
Figure 21 : Schéma représentatif du mécanisme oxydatif et non oxydatif d'un neutrophile ayant phagocyté une bactérie	55
Figure 22 : Organisation des gènes humains et murins de la NE.....	56
Figure 23 : Processus de maturation de la NE humaine.....	57
Figure 24: Biologie des sérine-protéase du neutrophile.....	58
Figure 25 : Structure tridimensionnelle de l'élastase humaine du neutrophile	59
Figure 26: Mutagenèse dirigée du gène murin de l'élastase	65

LISTE DES ABREVIATIONS

AHL:	Acylhomosérine lactone
AP3 :	Adaptator Protein 3
BPCO :	Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive
BPI:	Bacterial Permeability-Increasing protein
CFTR:	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CG:	Cathepsine G
DDB :	dilatation des branches
<i>E. coli</i> :	<i>Escherichia coli</i>
E-Sélectines:	Endothelial Cell selectins
ExoS, T, U et Y :	Exoenzyme S, T, U et Y
fMLP:	formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine
IgG:	Immunoglobulines G
IL-1R:	IL-1 Receptor
IL-6:	Interleukine 6
LPS:	Lipopolysaccharide
LRR:	Leucine-Rich Repeat
L-Sélectines:	Leukocyte Selectines
LTB4:	Leukotriene B4
MIP-2:	Macrophage Inflammatory Protein 2
MPO:	Myéloperoxydase.
MyD88:	Myeloid differentiation primary-response protein 88
NADPH:	Nicotinamide-Adenine Dinucleotide Phosphate
NE:	Elastase du neutrophile
NET:	Neutrophil Extracellular Traps
NF- κ B:	Nuclear factor kappa B
NLR:	Nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-like receptors
NSP:	Sérine Protéases du neutrophile
OMP :	Outer Membrane Protein
OprD:	Outer membrane protein D
OprE :	Outer membrane protein E

OprF :	Outer membrane protein F
OprG :	Outer membrane protein G
OprH:	Outer membrane protein H
ORF:	Open Reading Frame
<i>P. aeruginosa:</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAF:	Platelet-activating factor
PAMP:	Pathogen Associated Molecular Patterns
PAMPs:	Pathogen Associated Molecular Patterns
PNN:	Polynucléaire Neutrophile.
PR3:	Protéinase 3
PRR:	Pattern Recognition Receptors
P-Sélectines:	Platelet Selectines
QS:	Quorum sensing
RLH:	RIG-I-Like helicases
SLPI:	Secretory Leucocyte Peptidase Inhibitor
TIR:	TOLL/IL-1R homology
TLR:	Toll like Receptor
TNF- α :	Tumor Necrosis Factor- α .
PLA2:	Phospholipase A2

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS LIEES A L'ETUDE

Publications dans des revues à comité de lecture :

Publications portant sur le sujet de thèse :

Rym Benabid, Julien Wartelle, Nicolas Guyot, Laurent Leroy, François Lebargy, Sophie Gangloff, and Azzaq Belaoaouaj

Neutrophil elastase mediates the regulation of cytokines in the setting of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection.

(En cours de soumission).

Tim O. Hirche ³, Rym Benabid ³, Gaetan Deslee, Sophie Gangloff, Samuel Achilefu, Moncef Guenounou, François Lebargy, Robert E. Hancock, and Azzaq Belaoaouaj

Neutrophil Elastase Mediates Innate Host Protection against *Pseudomonas aeruginosa*.

³ T.O.H and R.B. contributed equally to this paper.

J Immunol. 2008 Oct 1 ; 181 (7) : 4945-5

Publications en relation avec le sujet de thèse :

EC. Crouch, TO. Hirche, R. Boxio, J. Wartelle, R. Benabid, B. McDonald, J. Heinecke, S. Matalon and A. Belaouaj

Myeloperoxidase-dependent inactivation of surfactant Protein D In vitro and in vivo.

(soumis)

R. Boxio, J. Wartelle, R. Benabid, B. Nawrocki-Raby, J.M Zahm, S. Dury, R. Lenaour, M. Guenounou, L. Andreoletti, F. Lebargy, F. Gauthier and A. Belaouaj.

Neutrophil elastase cleaves E-cadherin, implication in lung injury.

(en préparation)

Communications orales:

Rym Benabid, Julien Wartelle, Nicolas Guyot and Azzaq Belaaouaj

Neutrophil elastase mediates innate lung protection against *Pseudomonas aeruginosa*

Résumé soumis à: European Respiratory Society Annual Congress, Vienne, Autriche, 12-16 September 2009.

Benabid. R.

Rôle de l'élastase du neutrophile dans les infections pulmonaires à *Pseudomonas aeruginosa*.

Société de Biologie de Reims, France, 24 Octobre 2007.

Benabid. R, Poirier. T, Deslee. G, Lebargy. F, Boxio. R and Belaaouaj A.

Role of neutrophil elastase in host lung defense against *Pseudomonas aeruginosa*.

1 st European CF Young Investigator Meeting, Lille, France 29-31 Août 2007.

Tim O Hirche, Rym Benabid, Boxio Rachel and Azzaq Belaaouaj.

Mice Lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection.

Journées des Jeunes Chercheurs Contre la Mucoviscidose, Nogent sur Marne, France, April 6 and 7, 2006)

Communications par affiche:

Benabid. R, Hirche. T.O, Lebargy. F, Boxio. R and Belaaouaj A.

Rôle de l'élastase du neutrophile dans la défense de l'hôte contre l'infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa*.

Journée de Recherche Respiratoire, Paris, France 12-13 Octobre 2007.

Benabid. R, Poirier. T, Deslee . G, Lebargy. F, Boxio. R and Belaaouaj A.

Role of neutrophil elastase in host lung defense against *Pseudomonas aeruginosa*.

1 st European CF Young Investigator Meeting, Lille, France 29-31 Août 2007

Benabid R, Boxio R, Hirche T.O, Deslee G, Gangloff S, Guenounou M, Lebargy F, Belaouaj A.

Rôle de l'élastase du neutrophile dans la défense de l'hôte contre l'infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa*.

Journées des jeunes chercheurs, Reims, France 14 Juin 2007.

Rachel Boxio, Béatrice Nawrocki-Raby, Jean-Marie Zahm, Rym Benabid, Tiphaine Poirier, Noël Bonnet, Philippe Birembaut and Azzaq Belaouaj. Dégradation de la cadhérine-E par l'élastase du neutrophile : implication dans les lésions pulmonaires.

Journées de la Recherche Respiratoire, Tours, France, 13 et 14 Octobre, 2006.

Rym Benabid, Tiphaine Poirier, Rachel Boxio and Azzaq Belaouaj.

Les souris déficientes en l'élastase du neutrophile présentent une défense altérée contre l'infection pulmonaire par *Pseudomonas aeruginosa*.

Journée des jeunes chercheurs, Reims, France 13 Juin, 2006.

Introduction

Chapitre 1 : *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) est une bactérie à Gram négatif appartenant à la famille des *Pseudomonadaceae* qui inclut dix genres : *Azomonas*, *Azomonotrichon*, *Azorhizophilus*, *Azotobacter*, *Cellvibrio*, *Mesophilobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobacter*, *Rugamonas*, et *Serpens*. Le genre *Pseudomonas* regroupe 7 espèces : *P. aeruginosa*, *P. chlororaphis*, *P. fluorescens*, *P. pertucinogena*, *P. putida*, *P. stutzeri* et *P. syringae*. *P. aeruginosa* est l'espèce type du genre *Pseudomonas*. Sa taxinomie est présentée dans le tableau I :

Tableau I : Taxinomie de *P. aeruginosa*

Règne :	<i>Bacteria</i>
Embranchement :	<i>Prokaryota</i>
Division :	<i>Proteobacteria</i>
Classe :	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre :	<i>Pseudomonadales</i>
Famille :	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre :	<i>Pseudomonas</i>
Espèce :	<i>aeruginosa</i>

I- Caractéristiques générales :

I-1- Description :

P. aeruginosa est un bacille à Gram négatif non sporulant de forme droite ou légèrement courbée. Il mesure de 1 à 5 μm de long et de 0,5 à 1 μm de large (Figure 1). Bien que ce pathogène, ayant un métabolisme oxydatif, soit aérobic stricte, plusieurs isolats ont montré une capacité à croître en milieu anaérobic. *P. aeruginosa* est une bactérie motile grâce à la présence d'un flagelle monotriche polaire. Cette bactérie est catalase positive et oxydase positive. Elle possède une versatilité nutritionnelle remarquable pouvant utiliser une variété de sucres simples et complexes, d'alcools et d'acides aminés comme seule source de carbone. *P. aeruginosa* est une bactérie mésophile capable de se multiplier à l'intérieur d'un large spectre de température allant de 4 à 45°C. La température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C. La morphologie de *P. aeruginosa*, de même que pour tout le genre *Pseudomonas*, est facilement distinctive grâce à la production de la pyocyanine, un pigment bleu-vert diffusible dans le milieu extracellulaire, d'où le nom de bacille pyocyanique.

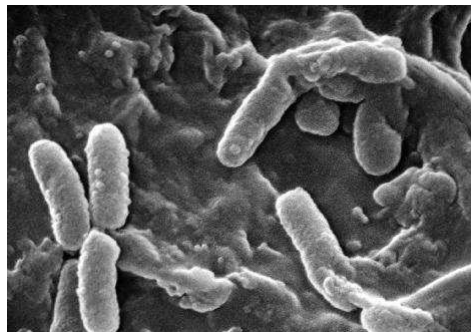


Figure 1 : *Pseudomonas aeruginosa* vue au microscope électronique

(www.science-et-vie.net)

I-2- Caractères structuraux :

La paroi bactérienne de *P. aeruginosa* est typique des bactéries à Gram négatif, composée d'une grande variété de molécules aux fonctions multiples (Figure 2). La paroi est formée de deux membranes séparées par le périplasme.

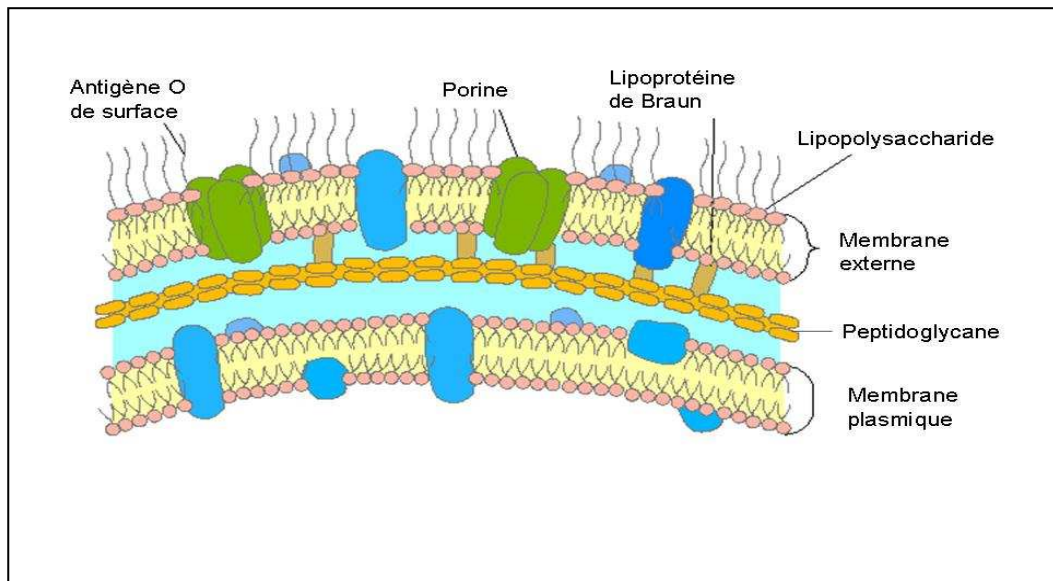


Figure 2 : Paroi de *P. aeruginosa*

(<http://microbiologie.spectrosociences.com>)

La paroi de *P. aeruginosa* est caractéristique de la paroi des bactéries à Gram négatif. Elle est constituée d'une membrane externe où sont localisés le lipopolysaccharide (LPS) et les porines et d'un espace périplasmique contenant le peptidoglycane.

La membrane plasmique mesure 2 à 3 nanomètres d'épaisseur. Elle contient des protéines poreuses aboutissant dans l'espace périplasmique. La couche fine de peptidoglycane adjacente à la membrane plasmique ne constitue que 5 à 10% du poids de la paroi. La membrane plasmique contient de nombreux complexes protéiques d'une importance vitale pour la bactérie (comme l'ATP *synthase*) qui ont des rôles prépondérants dans le métabolisme bactérien.

L'espace périplasmique est un espace de stockage d'enzymes et de nutriments qui participe également à la synthèse des protéines.

Les molécules de la membrane externe sont disposées en une bicouche épaisse d'environ 7 à 8 nanomètres, de structure semblable à celle de la membrane plasmique. La protéine la plus abondante est la lipoprotéine de Braun, une petite lipoprotéine attachée par liaison covalente au peptidoglycane sous-jacent et enfouie dans la membrane externe par son extrémité hydrophobe. La membrane externe est formée de lipopolysaccharide (LPS) et de

phospholipides, où s'insèrent de nombreuses protéines intrinsèques. Parmi elles, les porines, protéines transmembranaires formant des pores ou canaux protéiques permettant le passage de petits solutés et de molécules hydrophiles. Chez *P. aeruginosa*, on distingue OprD (D1 et D2), OprE (E1 et E2), OprF, OprG, et OprH. OprF est la porine majoritaire de *P. aeruginosa* (Nikaido H *et al.*, 1991).

I-3- Habitat et distribution environnementale :

La capacité de croissance de *P. aeruginosa* dans différentes conditions lui confère une large distribution environnementale. La bactérie prolifère aussi bien dans l'eau que dans le sol, ainsi que sur la majorité des espèces végétales. *P. aeruginosa* est très présente en milieu hospitalier et elle est responsable de nombreuses infections nosocomiales (11% des infections nosocomiales).

II- Pathogénie de *P. aeruginosa* :

La pathogénie de *P. aeruginosa* est liée à la production de nombreux facteurs de virulence membranaires et extracellulaires. Les facteurs de virulence sont des molécules qui permettent à la bactérie de survivre et de se multiplier dans différents microenvironnements, en particulier chez l'hôte (Figure 3).

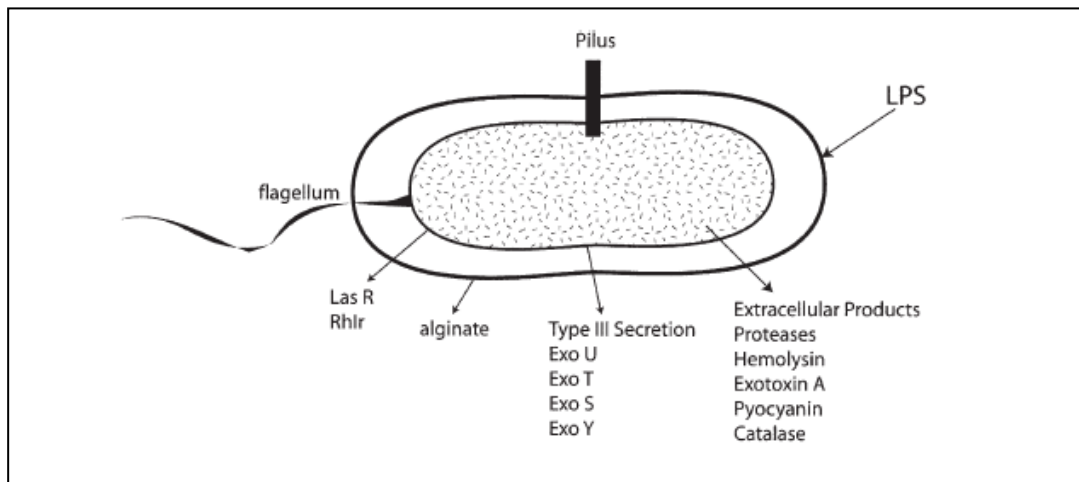


Figure 3 : Facteurs de virulence de *P. aeruginosa*

(Sadikot RT *et al.*, 2005)

Les facteurs de virulence de surface incluent le flagelle, le pili, et le LPS. Les facteurs sécrétés comportent les produits extracellulaires (protéases, hemolysine, Exotoxine A,...), les protéines du système de sécrétion de type III, les molécules du Quorum sensing et l'alginate.

II-1- Facteurs de virulence membranaire :

Parmi les facteurs membranaires on cite le flagelle, le facteur d'adhésion (pili de type IV), le lipopolysaccharide (LPS) et la porine OprF.

P. aeruginosa produit un flagelle monotriche polaire indispensable à la motilité bactérienne (Kohler T *et al.*, 2000). La flagelline est la principale protéine constitutive du flagelle, elle joue un rôle important dans l'induction de la réponse pro-inflammatoire de l'hôte (Szabo C., 2003). Le flagelle s'agrandit par l'addition de sous-unités de flagelline à l'extrémité la plus éloignée du corps cellulaire. Ces sous-unités diffusent à travers le domaine creux du flagelle, atteignant ainsi son extrémité (Figure 4). Le flagelle joue un rôle au stade initial de l'infection pulmonaire, permettant l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales respiratoires (Feldman M *et al.*, 1998).

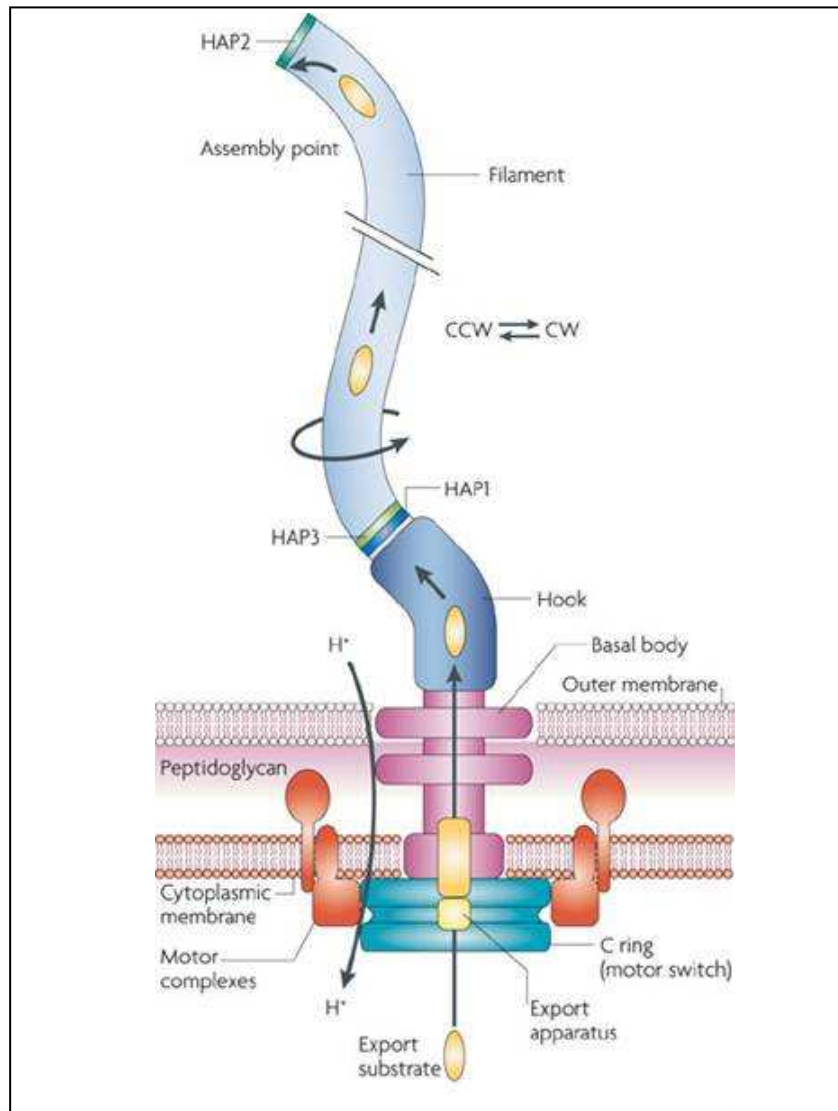


Figure 4 : Structure et assemblage d'un flagelle bactérien

(Jarell K.F and McBride M., 2008)

Le flagelle bactérien se compose de trois parties: le filament, le crochet et le corps basal. Le gradient de protons à travers la membrane cytoplasmique est essentiel à la rotation du flagelle dans le sens d'une aiguille d'une montre (CW) ou dans le sens contraire (CCW). (HAP : Hook associated protein).

P. aeruginosa exprime un nombre limité de pili polaires. Le pilus est une petite structure filamenteuse d'environ 6 nm de diamètre constituée d'empilements de monomères de la protéine appelée piline (Mattick J.S *et al.*, 2002). Les pili de *P. aeruginosa* sont parmi les rares pili procaryotes impliqués dans la motilité bactérienne. Les pili de type IV, par leurs propriétés rétractiles, permettent à *P. aeruginosa* d'envahir les surfaces hydratées et de

coloniser rapidement les voies respiratoires. Le pilus facilite aussi l'adhésion bactérienne aux cellules épithéliales en se liant au récepteur asialoGM1 (Gupta S.K *et al.*, 1994) et est indispensable à la virulence de *P. aeruginosa* (Comolli J.C *et al.*, 1999).

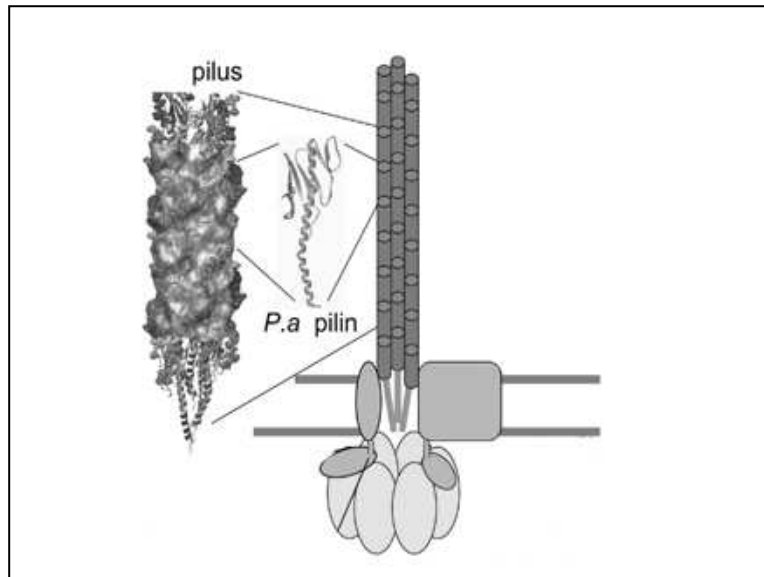


Figure 5 : Structure du Pilus de type IV de *P. aeruginosa*

(Craig L *et al.*, 2006)

Le LPS est un composant essentiel de la paroi bactérienne de *P. aeruginosa*. Il est constitué d'un lipide A, une région hydrophobe permettant l'ancrage de la structure dans la membrane externe, d'un cœur oligosaccharidique et de l'antigène-O, une partie polysaccharidique variable débordant de la membrane externe (Figure 6). Le lipide A possède des propriétés toxiques correspondant à l'endotoxine des bactéries Gram négatif et est responsable d'une stimulation excessive du système immunitaire pouvant provoquer un choc septique et conduire à la mort (Lynn W.A & Golenbock D.T., 1992). La variabilité de l'antigène-O est responsable de la spécificité antigénique O au sein d'une même espèce bactérienne. Selon que l'antigène O est présent ou absent sur le cœur oligosaccharidique, on parle respectivement de phénotype lisse ou rugueux. Le phénotype lisse a été souvent décrit comme plus virulent par rapport à un mutant isogénique possédant un phénotype rugueux (Cryz S.J. *et al.*, 1984).

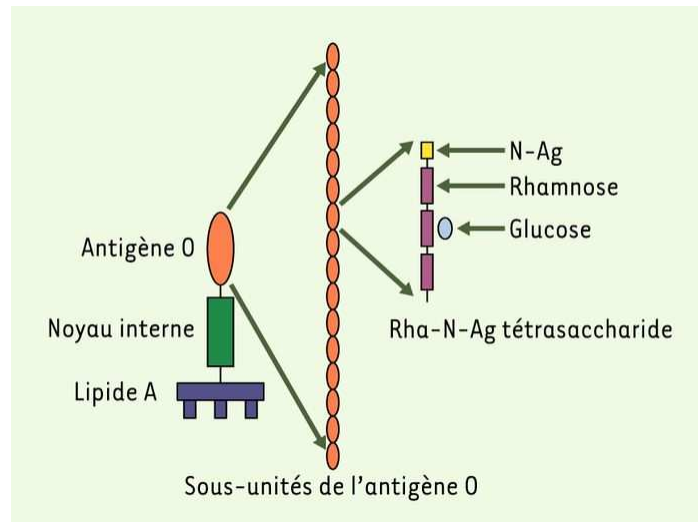


Figure 6 : Structure du LPS

(Gilgenkrantz S., 2005)

Le LPS comprend trois régions : une base lipidique (Lipide A), un noyau interne et une série de sous-unités formant l'antigène O.

La protéine OprF de la membrane externe de *P. aeruginosa* est une porine majeure (Figure 7). Il s'agit d'une protéine bifonctionnelle possédant une activité porine à travers son canal à eau et jouant le rôle de protéine de structure importante au maintien de l'intégrité bactérienne (Finnen RL *et al.*, 1992). Cette protéine forme un nombre limité de larges canaux au niveau de la membrane externe de *P. aeruginosa* (Rawling E.G *et al.*, 1995). Le diamètre du canal OprF est de 2 nm et permet la diffusion de polysaccharides ayant un poids moléculaire compris entre 2000 et 3000 daltons (Nestorovich E.M *et al.*, 2006). OprF possède un rôle structural déterminant dans la morphologie bactérienne et dans la capacité des bactéries à croître dans un milieu à faible osmolarité (Gotoh N *et al.*, 1989). Il a été démontré également qu'OprF contribue à l'adhérence bactérienne aux cellules épithéliales pulmonaires et facilite ainsi l'interaction de *P. aeruginosa* avec l'épithélium en favorisant la colonisation de l'épithélium respiratoire et l'initiation de l'infection pulmonaire (Azghani A.O *et al.*, 2002).

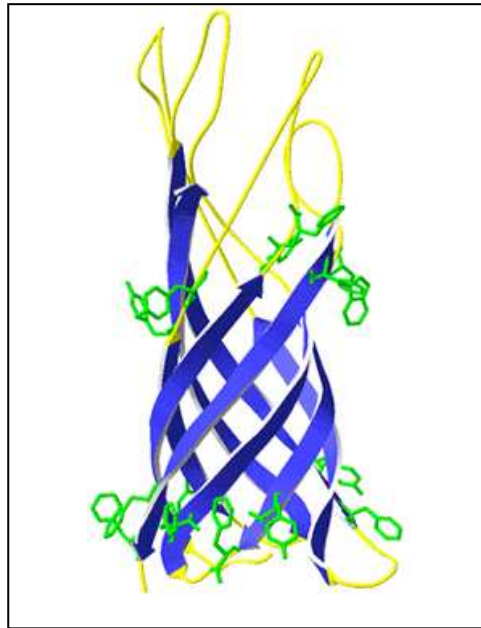


Figure 7 : Structure tridimensionnelle d'OprF de *P. aeruginosa*

(<http://cmdr.ubc.ca>)

II-2-Facteurs de virulence secrétés via le système de sécrétion de type III :

P. aeruginosa utilise un système de sécrétion de type III qui est un déterminant majeur de la virulence et permet à la bactérie d'injecter ses toxines dans la cellule hôte. Les protéines secrétées via le système de sécrétion de type III (ainsi que via le système de sécrétion de type I) sont transloquées à travers les deux membranes de l'enveloppe cellulaire en une seule étape sans intermédiaire périplasmique (Figure 8). Ce système de sécrétion, provoquant des infections aiguës, nécessite le contact des pili bactériens à la cellule épithéliale pour être activé.

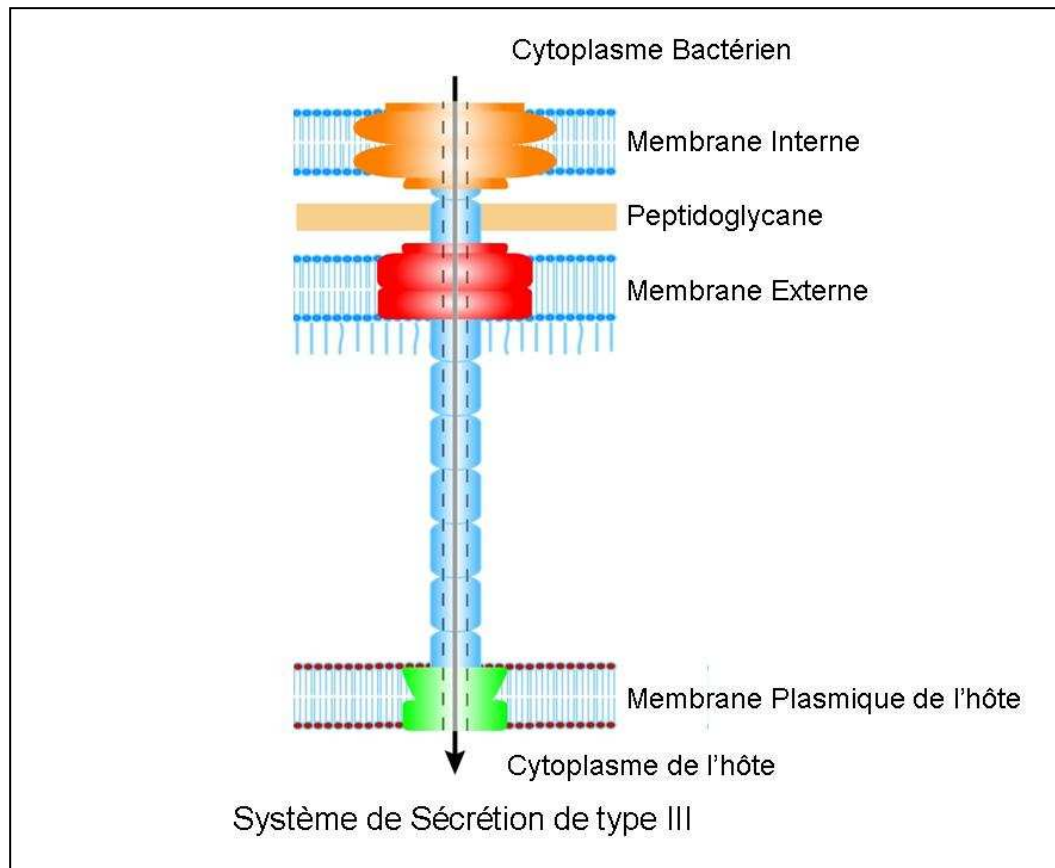


Figure 8 : Système de sécrétion de type III

P. aeruginosa secrète quatre exoenzymes à travers le système de sécrétion de type III :

ExoS, une ADP-ribosyltransférase, nécessaire à la destruction des tissus au site de l'inflammation et à la dissémination bactérienne (Nicas T.I *et al.*, 1985 ; Nicas T.I & Iglewski B.H, 1984). ExoS pourrait aussi contribuer à l'inflammation pulmonaire en stimulant la prolifération lymphocytaire (Barclay N.G *et al.*, 1999).

ExoT, une exotoxine qui semble interférer avec l'organisation des filaments d'actine, empêche l'exocytose, la progression du cycle cellulaire et la phagocytose (Krall R *et al.*, 2000) **ExoU**, une toxine nécrotique qui détruit les membranes cellulaires induisant la perméabilité des cellules épithéliales, des macrophages et des fibroblastes (Finck-Barbancon V *et al.*, 1997).

ExoY, une adénylate cyclase induisant une accumulation d'AMP cyclique dans les cellules intoxiquées de l'hôte (Yahr T.L *et al.*, 1998).

II-3- Autres facteurs de virulence secrétés :

P. aeruginosa exprime d'autres facteurs de virulence qui contribuent à sa pathogénécité en aidant sa colonisation ou en facilitant l'invasion bactérienne.

La colonisation bactérienne implique de multiples facteurs incluant les fimbriae ou les pili, le flagelle et les polysaccharides de surface. L'invasion tissulaire par *P. aeruginosa* est favorisée par la production d'élastase, de protéases alcalines, des hémolysines (phospholipases et lecithinase), cytotoxines (leukocidine), siderophores et du pigment pyocyanique.

II-3-1 Les protéases :

II-3-1-1 Les métalloprotéases :

a- L'élastase (Pseudolysine/Las B) :

L'élastase de *P. aeruginosa*, codée par le gène *lasB* est une métalloprotéinase (dépendante du zinc) secrétée par le système de sécrétion de type II (Moriyama K *et al.*, 1965). La voie de sécrétion de type II est un mécanisme de sécrétion en deux étapes. Les protéines sont, d'abord, transloquées par la machinerie à travers la membrane interne et sont ensuite secrétées à travers la membrane externe (Braun P *et al.*, 2001). L'élastase est une enzyme de 33 kDa (Kessler E & Safrin M, 1988) qui clive le collagène, les immunoglobulines G et A (IgG et IgA) ainsi que le complément (Hong Y.Q & Ghebrehiwet B., 1992 ; Heck L.W *et al.*, 1990). L'élastase perturbe l'intégrité de la barrière épithéliale en dérégulant les jonctions serrées des cellules épithéliales et interférant avec la clairance mucociliaire. Elle dégrade également les protéines du surfactant A et D (SP-A et SP-D) qui possèdent un rôle important dans l'immunité innée.

b- Las A (staphylolysine) :

La staphylosine (la protéine LasA) est codée par le gène *lasA* dont la transcription est régulée par le *quorum sensing* et est secrétée par le système de sécrétion de type II. Cette protéase de 20 kDa agit en synergie avec l'élastase pour la dégradation de l'élastine (Kessler E *et al.*, 1997). La staphylolysine est un facteur de virulence important lors des infections oculaires à *P. aeruginosa* (Estrellas P.S *et al.*, 2000).

c- La protéase alcaline (*Aeruginolysine*) :

La protéase alcaline, métalloprotéase de 56 kDa codée par le gène *aprA*, est la seule protéase sécrétée par le système de sécrétion de type I (ou transporteur ABC). Elle lyse la fibrine et interfère avec sa formation. Elle inactive les principales protéines de défense de l'hôte comme les anticorps, le complément, l'interféron- γ (IFN- γ) et les cytokines (Avidano M.A *et al.*, 1998).

II-3-1-2 les sérine-protéase :

a- La protéase IV (*Arginyl peptidase*):

La protéase IV est une sérine protéase de 26 kDa codée par le gène *prpL*. Cette enzyme est impliquée dans la dégradation du fibrinogène, de la plasmine, du plasminogène, de l'épithélium cornéen et des produits inflammatoires (Engel L.S *et al.*, 1998a ; Engel *et al.*, 1998b). Cette protéase est un facteur de virulence important du fait de son implication dans diverses infections telles que les kératites, les otites, les bactériémies et la mucoviscidose (Louis D *et al.*, 1998).

b- Las D:

Las D est une sérine protéase de 23 kDa (Park S *et al.*, 1995) qui possède une activité staphylolytique (la capacité de lyser les bactéries *staphylococci*) permettant à *Pseudomonas* de concurrencer *Staphylococcus* au niveau du poumon (Park S *et al.*, 1998).

II-3-2 La leucocidine :

La leucocidine est une protéine de 42,5 kDa produite par la plupart des souches pathogènes de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* (Nishiya H *et al.*, 1993). La leucocidine induit la lyse de plusieurs cellules participant aux défenses de l'hôte comme les granulocytes et les lymphocytes (Hirayama T *et al.*, 1984).

II-3-3 Les phospholipases et les lecithinases :

Les phospholipases et les lecithinases sont des hémolysines qui agissent synergiquement pour briser les lipides et la lecithine. Ces protéines favorisent l'invasion par leurs effets cytotoxiques sur les cellules hôtes.

II-4- Régulation de l'expression des facteurs de virulence ou « Quorum sensing » :

Le système de communication bactérienne appelée Quorum-sensing (QS) (Fuqua WC *et al.*, 1994) dépend de la densité bactérienne et repose sur la synthèse et la diffusion, de bactérie à bactérie, de petites molécules appelées acylhomosérines lactones (AHL). Chez *P. aeruginosa* le QS simplifie et coordonne l'expression de gènes dits de virulence par l'activation de leur transcription (Rashid M.H *et al.*, 2000). Deux systèmes de QS ont été découverts, le système *las* et le système *rhl*, contrôlant à eux deux la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la virulence.

Le système « *las* » contrôle l'expression des gènes des élastases LasA et LasB (*lasA* et *lasB*), de la protéase alcaline (*aprA*), de l'exotoxine A (*toxA*), et des protéines de la machinerie de sécrétion de type II Xcp (*xcrP* et *xcrR*) (Chpon-Herve V *et al.*, 1997). Le système « *rhl* » régule de nombreux gènes cibles comprenant l'opéron *rhlAB* qui active l'expression d'une série de gènes dont le gène de l'élastase B (*lasB*), de la protéase alcaline (*aprA*), de la pyocyanine (*pyc*) et les gènes des protéines impliquées dans la machinerie de sécrétion Xcp (*XcpR* et *XcpP*) (Le Berre R *et al.*, 2006).

III- Infections à *P. aeruginosa* :

Chez l'homme, ce pathogène est de plus en plus résistant aux antibiotiques et représente le bacille Gram négatif le plus rencontré dans les infections nosocomiales. Il est également responsable d'infections aiguës et chroniques.

P. aeruginosa cause principalement des infections opportunistes telles que les infections pulmonaires chez les patients immunodéprimés (patients atteints de leucémie, SIDA, cancer) ou ayant inhalé de l'air chaud lors d'un incendie. Les infections nosocomiales causées par ce pathogène sont associées à une intubation et une ventilation endotrachéale du patient. En effet, les patients hospitalisés, à priori ceux ayant nécessité une intubation oro-trachéale pour assistance respiratoire, présentent un risque de colonisation du tractus respiratoire par *P. aeruginosa*, majoré selon la durée de l'assistance respiratoire. En milieu hospitalier, *P. aeruginosa* peut également induire des infections postopératoires ou des bactériémies dont le pronostic est sévère.

P. aeruginosa est aussi la cause de méningites, de dermatites, d'otites externes, de kératites ulcéreuses chez les porteurs de verres de contact, d'infections de la peau chez les grands

brûlés, d'endocardites chez les patients abusant de drogues intraveineuses et d'infections nosocomiales du tractus urinaire (Bodey G.P *et al.*, 1983) (Figure 9). *P. aeruginosa* est aussi la cause majeure d'infections pulmonaires et de décès chez les patients atteints de mucoviscidose.

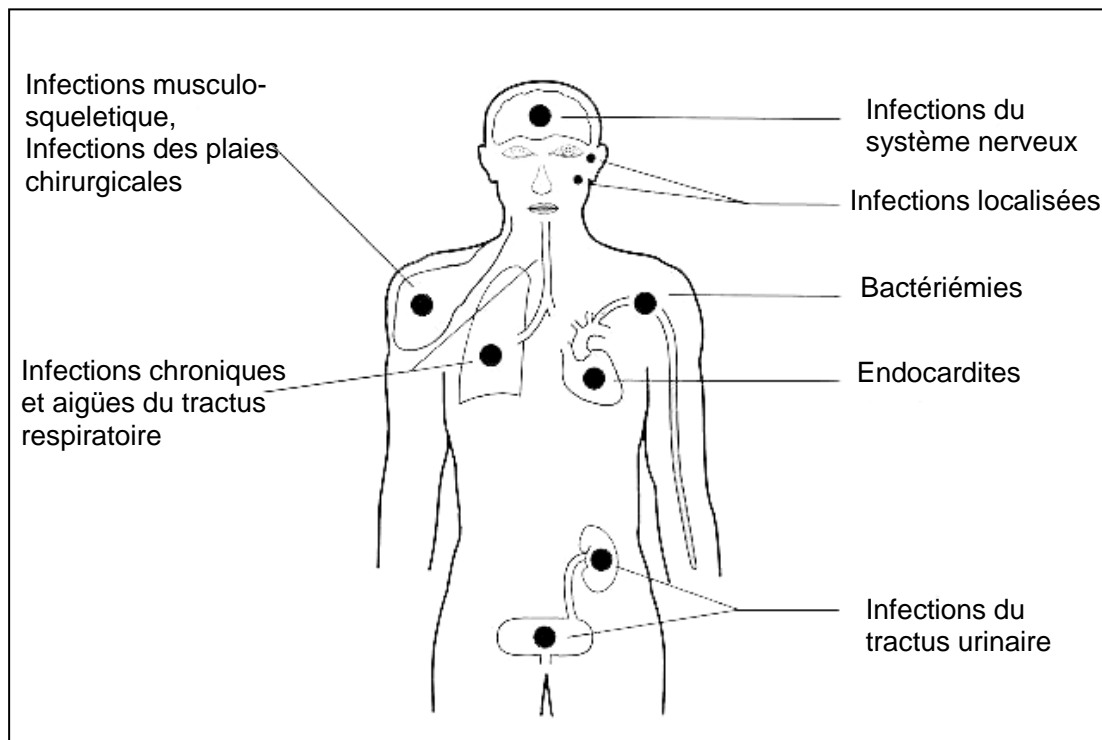


Figure 9 : Infections à *P. aeruginosa*

(<http://gsbs.utmb.edu>)

III-1 Infections chroniques :

P. aeruginosa est rencontré lors d'infections respiratoires chroniques telles que la mucoviscidose, la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) et la dilation des bronches (DDB).

La mucoviscidose est une maladie autosomique récessive létale caractérisée par une mutation du gène CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) qui code pour une protéine transmembranaire impliquée dans le flux d'ions chlorés (Cl^-) à travers la membrane plasmique (Bertrand C.A *et al.*, 2003). Il s'agit d'une maladie chronique du tractus respiratoire caractérisée par une obstruction des voies respiratoires et des infections récurrentes du poumon et du sinus paranasal dès le plus jeune âge. Le poumon

mucoviscidosique est particulièrement susceptible aux infections occasionnées par *P. aeruginosa*. Cet organisme joue un rôle crucial dans le développement et la progression des maladies pulmonaires chez les patients atteints de mucoviscidose (Wine J *et al*, 1999).

L'inflammation du tractus respiratoire causée par une infection chronique à *P. aeruginosa* est la cause majeure de morbidité et de mortalité chez les patients mucoviscidosiques (Khan Tz *et al*, 1995). En effet, la stratégie consistant à utiliser une antibiothérapie agressive a permis le contrôle des infections respiratoires à *Staphylococcus aureus* et *Haemophilus influenzae* mais a abouti à la sélection de souches de *P. aeruginosa* résistantes aux antibiotiques s'adaptant à l'environnement des poumons mucoviscidosiques, riches en mucus, en devenant des variants mucoïdes (Mashburn L.M *et al*, 2005). Le mucus présente un environnement propice à la croissance de *P. aeruginosa*, son hypersécrétion entraîne une augmentation de son épaisseur et la création d'un gradient d'O₂ qui va permettre la formation d'alginate par *P. aeruginosa* (Worlitzsch D *et al*, 2002).

La BPCO fait référence à un état décrit comme une bronchite chronique se traduisant par une inflammation chronique et un rétrécissement des voies aériennes. Chez les patients atteints de BPCO, la fréquence d'isolement de *P. aeruginosa* va de 3 à 18% en période d'exacerbation (Sethi S *et al.*, 2000). Le risque d'acquisition et de colonisation à *P. aeruginosa* chez ces patients est lié à quatre facteurs reconnus : la rencontre pathogène-bronches liés à l'environnement hospitalier (Robinson P *et al.*, 2003), la sélection de *P. aeruginosa* dans la flore du patient suite aux antibiothérapies, les altérations de la muqueuse bronchique et de la clairance mucociliaire, et les facteurs de virulence de *P. aeruginosa* favorisant la colonisation initiale (flagelle, pili de type IV) et la colonisation chronique (*quorum sensing*, biofilm).

La DDB est une affection chronique des bronches parfois congénitale mais le plus souvent faisant suite à des broncho-pneumopathies virales ou bactériennes à répétition, à la mucoviscidose, à l'inhalation d'un corps étranger, à la coqueluche ou à la tuberculose et se manifeste par une augmentation anormale et permanente du calibre des bronches.

Chez les patients atteints de DDB, *P. aeruginosa* est isolé dans 9 à 45% des cas selon les différentes populations. *P. aeruginosa* apparaît plus tardivement dans la maladie, huit ans après le diagnostic de la maladie (Benhamou D *et al.*, 1996). La présence de *P. aeruginosa* est corrélée avec une altération de la qualité de vie (Wilson CB *et al.*, 1997) et une mortalité plus élevée (Ho PL *et al.*, 1998).

III-2 Infections aiguës :

P. aeruginosa peut être responsable d'infections aiguës telles que les pneumonies.

Chez les patients immunodéprimés, particulièrement les patients transplantés, brûlés, atteints de cancers ou du SIDA, *P. aeruginosa* est à l'origine d'infections respiratoires (broncho-pulmonaires) graves. Les pneumonies aiguës associées à ce pathogène se compliquent fréquemment d'œdème pulmonaire majeur, de choc septique et de défaillance multiviscérale, accusant un taux de mortalité élevé, estimé de 50 à 70% selon les études, malgré une antibiothérapie adaptée (Faure K *et al.*, 2006).

Le taux de mortalité des infections respiratoires à *P. aeruginosa* chez les patients sous assistance respiratoire par ventilation mécanique varie de 34 à 48%. Cette bactérie représente le pathogène le plus fréquemment identifié chez les patients nécessitant une trachéotomie pour une ventilation mécanique continue (Rello J *et al.*, 2003).

P. aeruginosa peut rarement causer des infections chez des personnes saines. Quand ces infections se produisent, elles sont dues à une longue exposition aux aérosols d'eaux contaminées, avec un taux de mortalité de 33% (Hatchette T.F *et al.*, 2000).

IV- Résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques :

P. aeruginosa présente des résistances à certains antibiotiques ainsi qu'à une grande variété d'agents chimiques. L'un de ses mécanismes de résistance est lié à sa capacité de changer de phénotype en mutant d'une souche invasive non mucoïde à une souche mucoïde sur-exprimant l'alginate, une matrice d'exopolysaccharide qui favorise les conditions de la colonisation bactérienne au niveau du poumon (Martin DW *et al.*, 1993).

La mutation de *P. aeruginosa* responsable de la forme mucoïde (*muc*) est associée avec l'activation de la transcription du gène de l'alginate *algD*. La région critique responsable des formes mucoïdes et non mucoïdes contient trois gènes étroitement liés *algU*, *mucA*, et *mucB*. *AlgU* est un régulateur positif, *mucA* et *mucB* constituent le cluster de gènes contrôlant la conversion à la souche mucoïde. Une importante activation de la transcription de *algD* et la conversion à la souche mucoïde sont observées quand *mucA* ou *mucB* sont inactivés au niveau du chromosome des souches initialement non mucoïdes.

La production locale par *P. aeruginosa* d'exopolysaccharides (alginate) provoque la formation d'un biofilm. Le biofilm se définissant comme une population bactérienne adhérente à une surface et enrobée d'une matrice d'exopolysaccharide (Costerton J.W *et al.*, 1999).

Cette matrice représente 85 % du volume total et renforce la structure du biofilm tout en lui conservant une grande plasticité.

Le deuxième mécanisme pouvant être à l'origine de la résistance aux antibiotiques est que le pathogène a développé au cours de l'évolution des mécanismes de résistance intrinsèque et naturelle contre les composants antimicrobiens. (Stover C.K *et al.*, 2000).

V- Génome de *P. aeruginosa* :

Le génome de *P. aeruginosa* PAO1 a été complètement séquencé en 2000 (Figure 10). L'annotation des gènes est disponible sur le site internet www.pseudomonas.com.

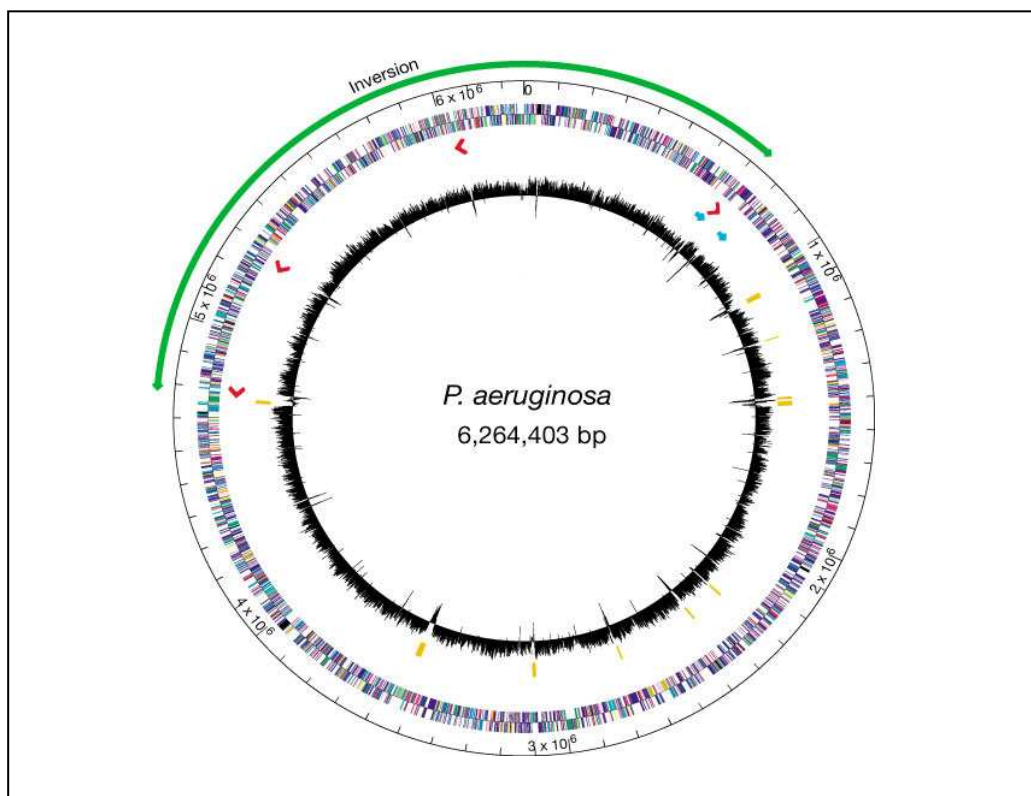


Figure 10 : Représentation circulaire du génome de *P. aeruginosa*

(Stover C.K *et al.*, 2000)

Ce génome englobe 6,3 millions de paires de bases, contenant 5 570 cadres de lecture ouverts (ORFs) dont la plupart sont riches en Guanine et Cytosine (G+C) (66,6%). Ses propriétés de mobilité (quatre types), son implication dans le métabolisme par différents systèmes, son pourcentage élevé de gènes régulateurs (9,4% de la totalité du génome soit 521 gènes) ainsi

que la multitude de ses systèmes de transport confèrent à *P. aeruginosa* une grande variabilité. Seuls 6.7 % de ses gènes ont une fonction bien connue dont 19% codent pour des protéines, soit 150 gènes codant pour les protéines de la membrane externe (OMPs).

Un nombre considérable de gènes de *P. aeruginosa* sont impliqués dans la régulation et les fonctions métaboliques. Cette diversité lui confère la capacité d'utiliser comme source de carbone un grand nombre de composés organiques et de se maintenir dans de nombreuses niches écologiques (Stover C.K *et al.*, 2000).

Chapitre 2 : Défense pulmonaire antibactérienne

I- Description générale de L'appareil respiratoire :

L'appareil respiratoire représente une vaste surface d'échange avec l'environnement extérieur. Sa fonction essentielle est d'assurer un échange de gaz entre le sang des veines et l'air atmosphérique : fonction remplie au niveau des alvéoles pulmonaires.

L'air inspiré descend dans la trachée, jusqu'aux bronches, qui se séparent pour pénétrer dans le poumon droit ou gauche. Les bronches elles-mêmes se ramifient en plusieurs bronchioles, qui se divisent en une demi-douzaine de canaux alvéolaires, qui sont d'étroits conduits s'ouvrant dans les sacs alvéolaires. Cette structure ramifiée unissant la trachée, les bronches, les bronchioles, les canaux alvéolaires et les sacs alvéolaires est appelée arbre bronchique. Une dizaine d'alvéoles sont réunies en grappes sur chaque sac alvéolaire. C'est au niveau des alvéoles, que l'oxygène apporté par l'inspiration traverse la membrane de la paroi alvéolaire pour être transféré vers les globules rouges contenus dans les capillaires. Inversement, les déchets gazeux passent des globules rouges à l'air des alvéoles, afin d'être éliminés par l'expiration (Figure 11). Les alvéoles sont particulièrement sensibles aux infections, car elles constituent un environnement humide et chaud, propice à la prolifération des bactéries et des virus.

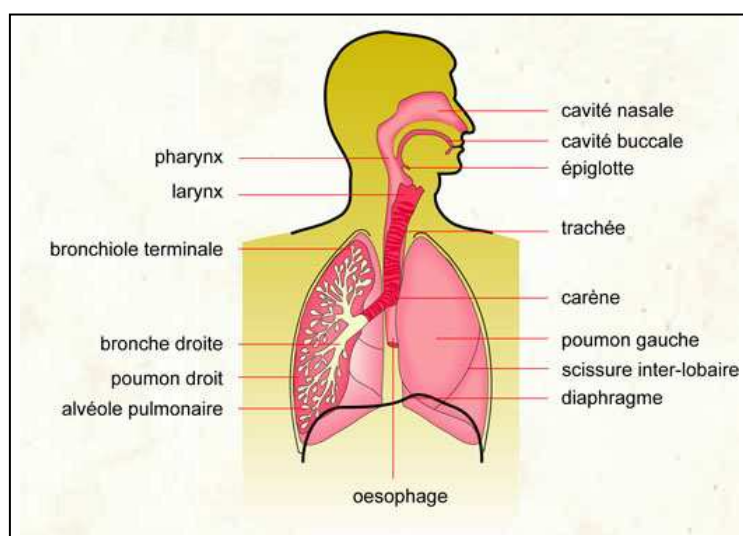


Figure 11 : Appareil respiratoire humain

(<http://infovisual.info>)

II- Mécanismes de défense immunitaire pulmonaire :

Les poumons représentent une interface unique entre le corps humain et l'environnement extérieur, avec une surface alvéolaire d'environ 75 m² pour une épaisseur de quatre à huit microns entre l'espace alvéolaire et la microcirculation. Cette configuration est optimale pour les échanges gazeux mais augmente aussi la vulnérabilité du poumon vis-à-vis des pathogènes, des particules et des gaz toxiques inhalés. Cette exposition constante du tractus respiratoire aux microorganismes nécessite la présence d'un système immunitaire efficace permettant d'initier rapidement la lutte anti-infectieuse.

Deux types de réponse immunitaire participent à la protection du poumon : la défense immunitaire innée (non spécifique) et la réponse immunitaire acquise (adaptative).

II-1- Défense innée de l'épithélium respiratoire :

La défense innée du poumon inclut différents mécanismes : (i) les défenses mécaniques de l'hôte contre les pathogènes, notamment les barrières initiales de protection contre toute invasion du poumon par des agents infectieux, (ii) la clairance mucociliaire et (iii) les molécules antimicrobiennes du mucus impliquées dans la défense innée constitutive de l'épithélium.

Le nez constitue la première barrière physique qui agit comme un filtre contre les grosses particules (>10 µm). Les particules ayant un diamètre supérieures à 5 µm sont généralement retenues dans la partie supérieure des voies aériennes. En revanche, les particules ayant un diamètre inférieur à 5 µm échappent à ces défenses et accèdent aux voies respiratoires.

La couverture mucociliaire tapissant la surface des voies aériennes contient des glycoprotéines complexes dénommées mucines capables de retenir les microorganismes et de les piéger. Ces particules piégées sont par la suite éliminées par la clairance mucociliaire, mécanisme de battement coordonné et orienté des cils qui propulse le mucus vers la trachée et l'oropharynx et qui est ensuite avalé ou expectoré (Evans J.H & Sanderson M.J., 1997).

Toutefois, des mécanismes de défense additionnels sont nécessaires afin de maintenir une certaine « stérilité » du poumon et de préserver l'intégrité de l'épithélium respiratoire. En effet, une variété de molécules possédant des propriétés antimicrobiennes directes à large spectre d'action et facilitant l'élimination des agents infectieux par phagocytose est produite par les cellules des voies inférieures et supérieures du tractus respiratoire (Rogan MP *et al.*, 2006) et les cellules phagocytaires présentes naturellement dans les poumons (macrophages résidents) ou recrutées au site de l'infection (neutrophiles). Ces molécules englobent la

lactoferrine, le lysozyme, les inhibiteurs des protéases (SLPI), les défensines, la cathélicidine LL37, la BPI, les collectines, la lactoperoxydase, le complément et les immunoglobulines A et G (Rogan M P *et al.*, 2006).

II-1-1 Les molécules de la défense innée :

a- Lactoferrine :

La lactoferrine est une protéine hautement cationique sécrétée par les granules secondaires du neutrophile. Elle possède des propriétés à la fois antimicrobiennes et anti-inflammatoires. Ses effets antimicrobiens résident dans sa capacité à être directement bactéricide et bactériostatique. Il a été démontré récemment que la lactoferrine inhibe la formation du biofilm chez *Pseudomonas* (Singh PK *et al.*, 2002).

b- Lysozyme :

Le lysozyme humain présent au niveau de l'appareil respiratoire est une enzyme antibactérienne sécrétée en grande quantité essentiellement par les glandes de la sous-muqueuse trachéale, l'épithélium de surface et les macrophages alvéolaires pulmonaires (Konstan M.W *et al.*, 1982). Le lysozyme est une protéine basique stockée dans les granules primaires et secondaires du neutrophile. Il possède la capacité de lyser la paroi bactérienne et de tuer les bactéries selon un mécanisme non spécifique (Laible N.J *et al.*, 1985). Le lysozyme est hautement actif contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Cole A.M *et al.*, 2002).

c- SLPI / Elafine:

Le « Secretory Leucocyte Proteinase Inhibitor » (SLPI) est une protéine hautement basique exprimée par les macrophages, les neutrophiles et les cellules épithéliales (Melrose J *et al.*, 1992). Le domaine N-terminal du SLPI possède une activité antimicrobienne *in vitro* contre les bactéries à Gram négatif et à Gram positif (Hiemstra PS *et al.*, 1996). Le domaine C-terminal du SLPI est un inhibiteur des sérine-protéase conférant ainsi une protection significative contre l'élastase du neutrophile et la cathepsine G (Gauthier F *et al.*, 1982). De plus, le SLPI possède des propriétés anti-inflammatoire en sous-régulant le TNF- α et en inhibant le NF κ B (Taggart CC *et al.*, 2005).

L'élafine, identifiée à l'origine comme un inhibiteur de protéases, possède une activité antibactérienne contre les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif. Les

fonctions antimicrobiennes de l'élafine ont été identifiées grâce à des études réalisées avec *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* (Williams SE *et al.*, 2006). L'extrémité N-terminale de l'élafine est cationique et représente le domaine bactéricide contre *Pseudomonas aeruginosa* ; l'extrémité C-terminale de l'élafine représente le domaine bactéricide contre *Staphylococcus aureus* ; la protéine entière est hautement bactéricide contre les deux bactéries à la fois (Fitch P.M *et al.*, 2006).

Toutefois, il est à noter qu'un homologue murin direct de l'élafine humaine n'existe pas (Hagiwara K *et al.*, 2003).

d- Défensines :

Les défensines sont des peptides de 3 à 5 kDa, membres d'une large famille aux caractéristiques de repliement tridimensionnel comportant six cystéines formant des ponts disulfures. Les défensines ont des activités cytotoxiques contre les bactéries, les levures, les parasites, les virus et même certaines cellules hôtes (Martin E *et al.*, 1995). Elles se subdivisent en différentes classes qui comportent les alpha- et bêta-défensines. Les alpha-défensines sont aussi connues sous le nom de HNP (Human Neutrophil Peptide). Les alpha-défensines contribuent à la réparation des poumons en stimulant la prolifération des cellules épithéliales (Aarbiou J *et al.*, 2002). Les bêta-défensines 2 et 3 sont secrétées en réponse au LPS et aux cytokines (TNF- α , IL-1 β). Les bêta-défensines 1 à 3 sont actives contre les bactéries à gram négatif.

e- Cathélicidine LL-37 :

Les cathélicidines sont une famille de protéines antimicrobiennes stockées dans les granules spécifiques du neutrophile. La cathélicidine LL-37 est présente également dans certains lymphocytes, le tissu testiculaire et l'épithélium des voies aériennes (Agerberth B *et al.*, 2000). La cathélicidine LL-37 est le seul membre identifié jusqu'à présent (Bals R *et al.*, 2003 ; Agerberth B *et al.*, 2000 ; Sorensen O *et al.*, 1997). LL-37 est capable de réduire la charge bactérienne de *Pseudomonas* quand elle est surexprimée dans un modèle murin (Bals R *et al.*, 1999).

f- BPI (Bacterial Permeability-Increasing protein):

La BPI est une protéine de 55 kDa très active contre les bactéries à Gram négatif (Beamer LJ *et al.*, 1997). Elle est exprimée par l'épithélium (Canny G *et al.*, 2002) et les fibroblastes (Reichel PH *et al.*, 2003). La BPI est stockée dans les granules primaires du neutrophile et exerce ses effets selon trois mécanismes différents : (i) toxicité directe de la BPI sur la membrane bactérienne, (ii) : stimulation de la phagocytose des neutrophiles, (iii) capacité de la BPI à neutraliser le LPS bactérien (Elsbach P *et al.*, 1998a). En synergie avec d'autres protéines du système immunitaire inné, la BPI possède un domaine N-terminal hautement cationique contenant des zones de neutralisation bactéricide (Elsbach P *et al.*, 1998b). La BPI agit en association avec d'autres protéines telle que les cathélicidines et les défensines pour tuer les bactéries. Elle possède également un rôle dans la sous régulation des effets pro-inflammatoires des bactéries à gram négatif et des endotoxines *in vivo* (Levy O *et al.*, 1995).

g- Lactoperoxydase (LPO) :

La muqueuse des voies respiratoires sécrète une peroxydase, capable de prévenir les infections des voies aériennes (Christensen T.G *et al.*, 1981). La lactoperoxydase (LPO) contribue majoritairement aux défenses des voies respiratoires. En effet, l'inhibition de la LPO conduit à une diminution significative de la clairance bactérienne dans les voies respiratoires (Cerson C *et al.*, 2000). La LPO fournit une protection additionnelle contre les virus (Pourtois M *et al.*, 1991 ; Tenovuo *et al.*, 1995) et les infections fongiques (Lenander-Lumikari M *et al.*, 1992 ; Popper L *et al.*, 1997) et possède une activité contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* et *Haemophilus influenzae* (Wijkstrom-Frei C *et al.*, 2003).

h- Collectines (les protéines du surfactant A et D) :

Le surfactant pulmonaire est une lipoprotéine complexe synthétisée par les pneumocytes de type II et les cellules de Clara. Le surfactant joue un rôle dans la défense de l'hôte contre l'infection. Les protéines du surfactant appartiennent à la famille des collectines et du « collagène like lectin » (Crouch E *et al.*, 2000 ; Crouch E *et al.*, 2001). Ce sont des opsonines clés facilitant la phagocytose des bactéries et des virus par les macrophages et les monocytes (Lawson P.R *et al.*, 2000).

i- Phospholipase A2 (PLA2) :

Les Phospholipase A2 (PLA2) correspondent à une famille d'enzymes qui hydrolisent les phospholipides membranaires, conduisant à la libération de phospholipides et d'acides gras libres (Six DA., 2000). Parmi les PLA2 on distingue la PLA2 cytosolique (cPLA2) et la PLA2 sécrétée (sPLA2) produite par divers types cellulaires notamment les macrophages alvéolaires (Touqui L *et al.*, 2005). La sPLA est bactéricide contre les bactéries Gram positif mais nécessite le recrutement de co-facteurs (telle que la BPI et le système du complément) pour exercer une activité bactéricide contre les bactéries Gram négatif. La sPLA de type IIa est bactéricide contre *P.aeruginosa*. L'activité bactéricide de IIa sPLA repose sur sa capacité à altérer l'intégrité de la paroi bactérienne (Dubuix A *et al.*, 2003).

II-1-2 Les macrophages alvéolaires :

Les macrophages alvéolaires sont les cellules immunitaires résidentes du poumon et représentent la première ligne de défense phagocytaire contre tout agent infectieux tel que les microorganismes, les toxines, ou autres particules qui atteignent l'espace alvéolaire. Les macrophages alvéolaires ont une longue durée de vie (plusieurs mois) et sont dérivés de monocytes sanguins. Ces cellules possèdent des fonctions phagocytaires, micro-bactéricides et sécrétoires très importantes et jouent un rôle primordial dans l'immunité du poumon en initiant les réponses inflammatoires et immunitaires.

II-1-3 Reconnaissance du pathogène:

Les cellules épithéliales des voies aériennes et les macrophages alvéolaires représentent la première ligne de défense contre toute infection. Elles reconnaissent des motifs moléculaires hautement conservés et très souvent associés à des pathogènes qu'on appelle PAMPS (pathogen-associated molecular patterns) grâce à des récepteurs cytoplasmiques, membranaires ou extracellulaires; les « pattern recognition receptors » ou PRRs. Elles initient ainsi le signal approprié à l'élimination du pathogène ainsi qu'à l'activation de l'immunité acquise (Kumagai Y *et al.*, 2008). Les PRRs les plus connus sont les récepteurs TLR (Toll Like Receptor). Les PAMPS reconnus par les TLR regroupent une large variété de molécules telles que les carbohydrates, les lipides, les protéines et les acides nucléiques. Des études récentes ont montré la présence d'autres types de récepteurs PRRS appelé les récepteurs NLRs (Nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-like receptors) et les récepteurs

RLHs (RIG-I-like helicases). Ces récepteurs jouent un rôle important dans la réponse immunitaire innée (Akira S *et al.*, 2006) (Figure 12).

La reconnaissance des bactéries par les cellules épithéliales induit la production de chimiokines et de cytokines qui servent au recrutement et à l'activation des cellules phagocytaires, principalement les neutrophiles, au site de l'infection (Gomez M.I *et al.*, 2007).

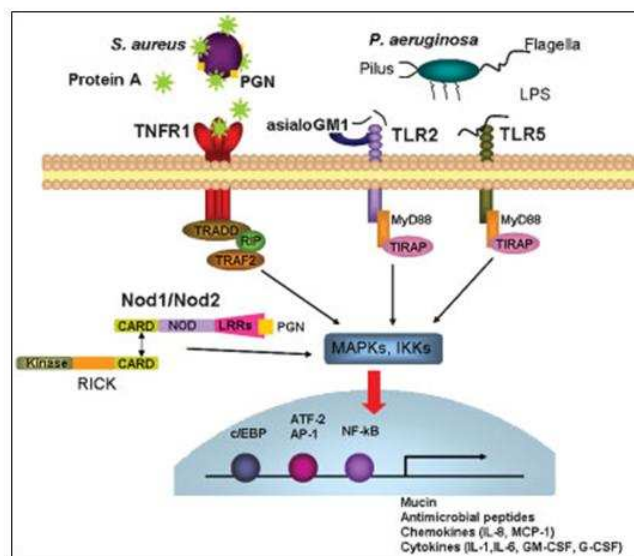


Figure 12 : Reconnaissance du pathogène par les cellules épithéliales
(Gomez MI *et al.*, 2008)

Les ligands bactériens de *P. aeruginosa* sont reconnus par des récepteurs de surface (asialoGM1, TLRs). Une cascade de signalisation est ainsi initiée à travers des protéines adaptatrices (MyD88/TIRAP, TRADD/RIP) résultant en la transcription de médiateurs pro-inflammatoires.

II-1-4 Les récepteurs TLRs :

Les récepteurs TLRs des mammifères sont des glycoprotéines transmembranaires contenant un domaine extracellulaire LRRs (Leucine-rich repeat) responsable de la reconnaissance du

ligand et un domaine cytoplasmique TIR (TOLL/IL-1R homology) nécessaire à l'initiation de la signalisation (Akira S *et al.*, 2004) (Figure 13).

Onze TLRs humains et treize TLRs murins ont été identifiés jusqu'à présent (Roach J.C *et al.*, 2005).

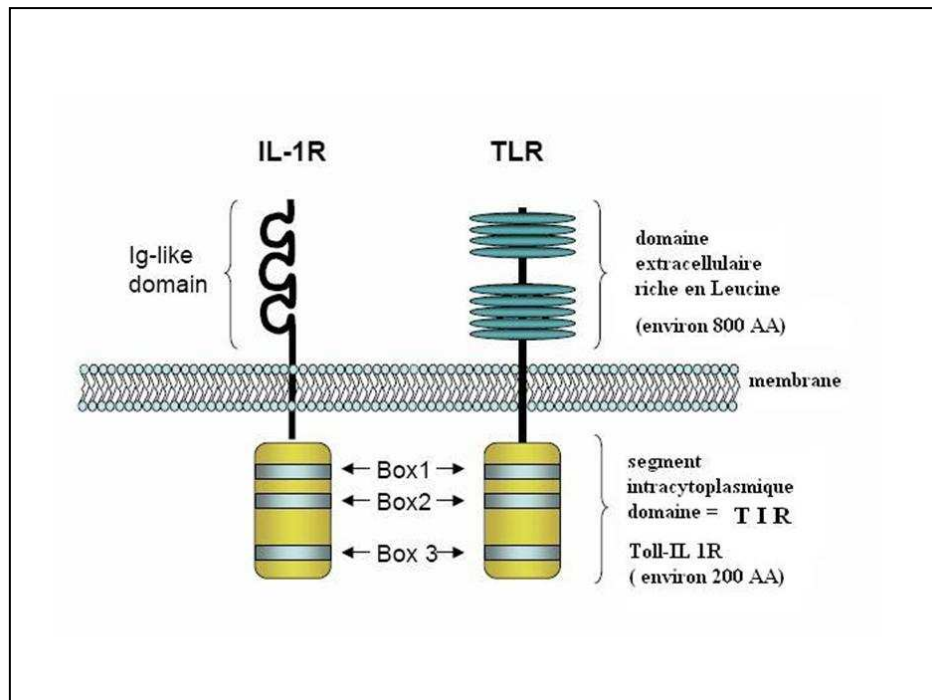


Figure 13 : Comparaison de la structure des récepteurs TLR avec l'IL-1R

(<http://acces.inrp.fr>)

Les TLR sont des protéines transmembranaires constituées par : un domaine extracellulaire riche en Leucine (domaine LRR : Leucine Rich Repeat), une partie transmembranaire riche en cystéines et un domaine intracytoplasmique que l'on retrouve chez les récepteurs des interleukines IL-1 et IL-18 (domaine TIR : Toll/IL-1 Receptor)

Les TLRs 1, 2, 4, 5 et 6 sont principalement localisées à la surface cellulaire et reconnaissent surtout les composants bactériens, les récepteurs TLRs 3, 7, 8 et 9 sont principalement intracellulaires et reconnaissent surtout les produits viraux (Akira S *et al.*, 2006) (Figure 13).

Les récepteurs TLRs agissent en homodimères, hétérodimères ou en association avec d'autres LRRs, ils sont capables de reconnaître divers composants bactériens, fongiques, parasitaires et viraux tels que les lipides bactériens, le LPS, les lipopeptides, les protéines microbiennes, les acides nucléiques tel que l'ARN simple brin et double brin et les îlots CpG

de l'ADN (Tableau II) (Figure 14). Certains TLRs reconnaissent des ligands endogènes tel que la chromatine qui est reconnue par le récepteur TLR9 (Rifkin IR *et al.*, 2005).

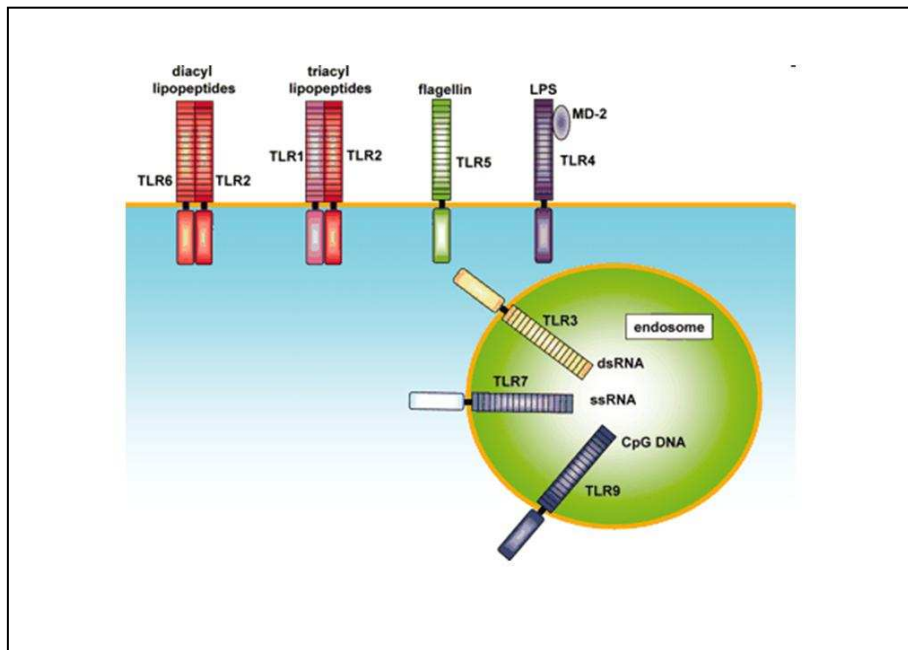


Figure 14 : Localisation cellulaire des TLRs

(Takeda K *et al.*, 2005)

Les TLRs 1, 2, 4, 5 et 6 sont localisées en surface (dans la membrane cellulaire), les TLRs 3, 7 et 9 sont en position intracellulaire (dans la membrane de l'endosome).

Tableau II : Ligands bactériens et leurs récepteurs épithéliaux

(Marisa I *et al.*, 2008)

<i>Ligands bactériens</i>	<i>Récepteur</i>
Flagelle, pili, bactéries Gram négatif et Gram positif	asialoGM1
Acide lipotéichoïque, lipoprotéines, flagelle, lipoarabinomannane, modulines solubles dans le phénol.	TLR2
Flagelle	TLR5
Protéine A	TNFR1, EGFR
Peptidoglycane	NOD1/2
LPS	TLR4

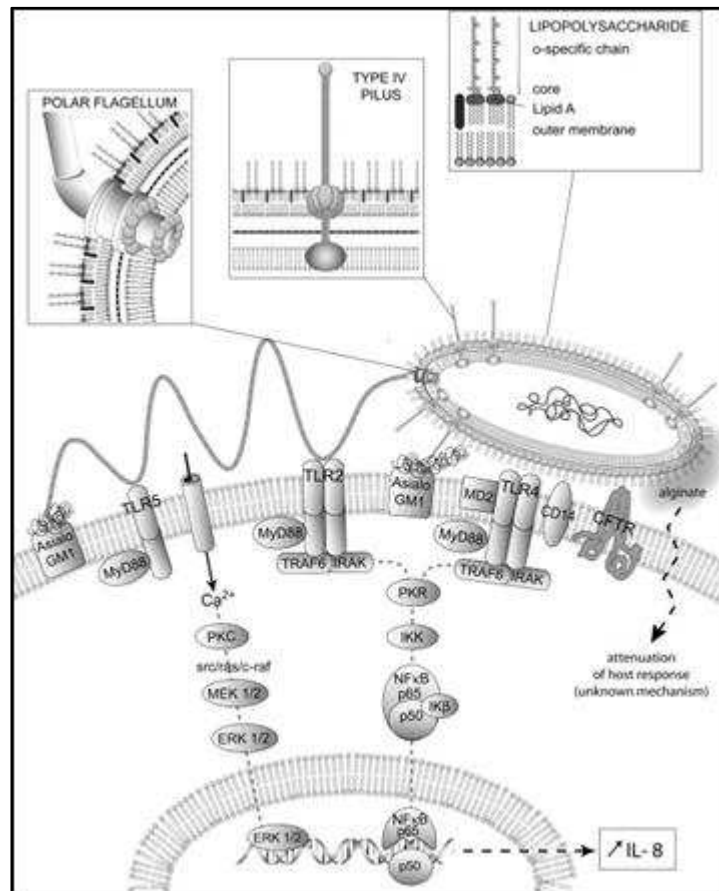


Figure 15 : Reconnaissance des facteurs de virulence membranaires de *P. aeruginosa* (Kipnis E *et al.*, 2006).

Une fois que *P. aeruginosa* a atteint l'épithélium respiratoire, le pathogène se lie à la cellule épithéliale par son flagelle et son pili à travers asialoGM1, CD14 et/ou CFTR. L'interaction du flagelle avec TLR5 active une entrée de Ca^{2+} dans la cellule hôte conduisant à une augmentation de la transcription du gène de l'IL-8. L'interaction du flagelle avec TLR5 et du LPS avec TLR4/MD2 conduit également à une augmentation de la transcription du gène de l'IL-8.

Les récepteurs TLRs initient différentes voies de signalisation en recrutant différentes combinaisons de quatre molécules adaptatives distinctes : MyD88 (Myeloid differentiation primary-response protein 88), TIRAP (MAL), TRIF (TICAM1) et TRAM (Akira S *et al.*,

2004). Tous les TLRs activent des voies de signalisation aboutissant communément à l'activation de NF- κ B (Figure 16).

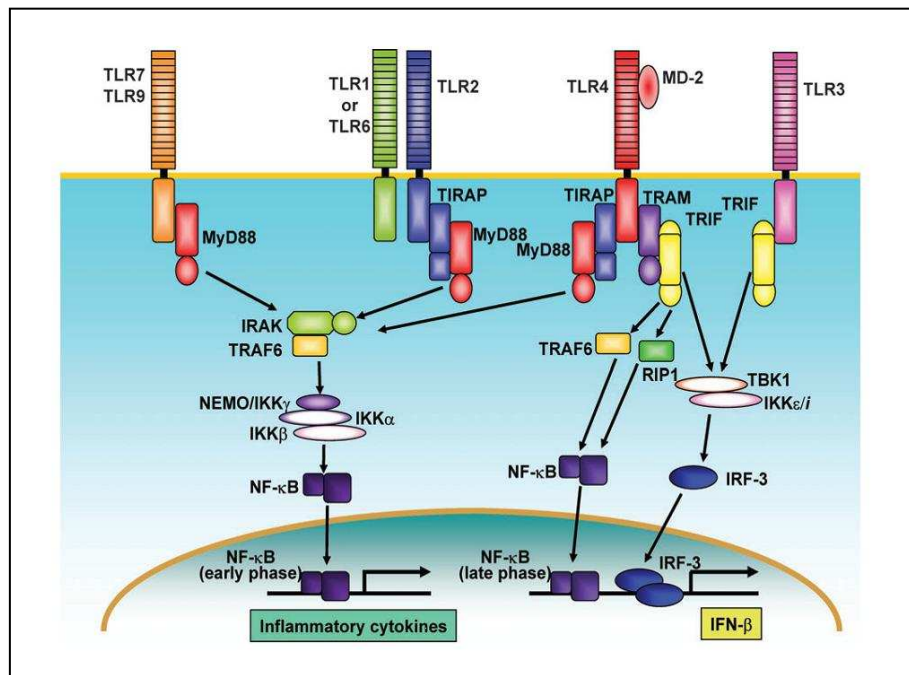


Figure 16 : Voie de signalisation des TLRs

(Takeda K *et al.*, 2005)

La voie de signalisation MyD88 est utilisée par tous les récepteurs TLRs excepté TLR3 ; la voie de signalisation TIRAP est utilisée par TLR2 et TLR4 ; la voie de signalisation TRIF est utilisée par TLR3 et TLR4 et la voie de signalisation TRAM est utilisée seulement par le récepteur TLR4 (Kawai T *et al.*, 2006).

Parmi ces différents TLRs, TLR2, TLR4 et TLR5 jouent un rôle majeur dans la signalisation épithéliale en réponse à une infection pulmonaire par *P. aeruginosa*.

Ci-après sont introduits les TLRs qui sont souvent associés à l'infection par *P. aeruginosa* :

α- Récepteur TLR2 :

TLR2 est présent à la surface apicale des cellules polarisées, il reconnaît une variété de composants microbiens incluant les lipoprotéines, les lipopeptides, l'acide lipotéichoïque des bactéries Gram négatif et Gram positif, le lipoarabinomannane des mycobactéries, les

modulines solubles dans le phénol du genre *Staphylococcus* ainsi que le flagelle de *P. aeruginosa* (Akira S *et al.*, 2004).

TLR2 forme un complexe avec asialoGM1 (asialoganglioside gangliotetrasylceramide) à la surface apicale des cellules épithéliales (Soong G *et al.*, 2004). Des études ont montré que le pili de *P. aeruginosa* se lie à la partie apicale d'asialoGM1 exposée à la surface des cellules des voies aériennes. Le complexe asialoGM1-TLR2 active une cascade de signalisation (MyD88 → interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) → TNF-receptor-associated factor 6 (TRAF6)) ainsi que la libération de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique (Chun J *et al.*, 2006). Le complexe TLR2-asialoGM1 initie la signalisation pro-inflammatoire en réponse aux contenus bactériens conduisant à l'activation du facteur nucléaire NF- κ B et à la production de l'IL-8 (Soong G *et al.*, 2004).

L'expression de l'ARNm de TLR2 augmente dans les poumons suite à une infection par des bactéries Gram négatif et Gram positif.

b- Récepteur TLR4 :

TLR4 est un récepteur essentiel pour la reconnaissance du LPS par les cellules immunitaires. En effet, le LPS se fixe à la molécule LBP présente dans le sérum ; ce complexe LPS-LBP se fixe alors au récepteur membranaire CD14 (Cluster of Differentiation receptor 14). TLR4 s'associe à la molécule MD2 pour reconnaître le complexe CD14-LPS-LBP (Nagai Y *et al.*, 2002). En absence de CD14, le complexe TLR4-MD2 est capable de faire la distinction entre le LPS rugueux et le LPS lisse. Le LPS rugueux se liant au complexe TLR4-MD2 initie un signal dépendant de la voie de signalisation MyD88. Par contre, le LPS lisse nécessite la présence de CD14 pour initier la signalisation (Jiang Z *et al.*, 2005).

TLR4 est capable d'initier deux voies de signalisations majeures, la voie MyD88 dépendante et la voie TRIF dépendante (MyD88 indépendante) (Akira S *et al.*, 2004). Le rôle majeur de la voie de signalisation MyD88 dépendante est d'induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, IL-12 et TNF- α alors que le rôle majeur de la voie de signalisation TRIF dépendante, nécessitant le recrutement de TRAM et TRIF, est d'augmenter l'expression des molécules de co-stimulation ainsi que l'expression des IFNs de type I (Kawai T *et al.*, 1999 ; Hoebe K *et al.*, 2003). Toutefois, les deux voies de signalisation semblent coopérer afin d'augmenter l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Kawai T *et al.*, 2006).

La voie de signalisation MyD88 dépendante conduit à l'activation des protéines IRAK et TRAF6, l'activation finale de la voie de signalisation NF- κ B et l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Chen Z.J *et al.*, 2005).

c- Récepteur TLR5 :

TLR5 est capable de reconnaître la flagelline, le composant majeur du flagelle bactérien (Smith KD *et al.*, 2003). L'importance de TLR5 dans la médiation de la réponse pro-inflammatoire contre le flagelle et dans la clairance de *P. aeruginosa* durant l'infection pulmonaire a été récemment démontrée *in vivo* en utilisant des souris déficientes en TLR5 (Feuillet V *et al.*, 2006). Bien que TLR5 soit exprimé au niveau des cellules épithéliales des voies aériennes, il n'est pas abondant à la surface apicale des cellules mais peut être recruté suite à une exposition au flagelle qui peut être reconnu aussi par asialoGM1/TLR2. L'interaction initiale entre le flagelle et TLR2-asialoGM1 est capable d'activer une réponse épithéliale qui entraîne la transcription de TLR5 et sa mobilisation au niveau de la surface apicale où il est capable de médier une signalisation plus spécifique suite à l'interaction TLR5 - flagelle (Adamo R *et al.*, 2004).

II-2- Défenses immunitaires acquises du poumon :

La capacité de reconnaître spécifiquement tous les pathogènes et de conserver une mémoire immunitaire contre eux sont des caractéristiques de l'immunité adaptative, dite aussi spécifique ou acquise.

L'inhalation d'un microorganisme étranger active les cellules dendritiques qui se différencient en cellules présentatrices d'antigènes. Celles-ci migrent ensuite depuis le site inflammatoire jusqu'aux organes lymphoïdes périphériques où elles présentent aux lymphocytes T les antigènes étrangers. Les lymphocytes ainsi activés prolifèrent dans les tissus lymphoïdes qui drainent l'ensemble des lymphocytes naïfs et les cellules présentatrices d'antigènes. Les lymphocytes se transforment en quelques heures en lymphoblastes activés. L'immunité acquise n'intervient qu'après un délai de quelques jours (quatre à cinq jours), temps nécessaire à l'expansion clonale d'un seul lymphocyte naïf (lymphoblaste) en 1000 cellules filles identiques. Ces dernières se spécialisent ensuite en cellules effectrices mémoires. Une fois l'antigène éliminé, la plupart des cellules lymphocytaires meurent par apoptose. Toutefois, quelques-unes persistent et deviennent des cellules mémoires constituant la base de mémoire immunologique qui assure une protection immune durable. Grâce à ces

cellules mémoires, une réponse efficace apparaîtra plus rapidement lors d'un second contact avec le même antigène.

III- Réponse inflammatoire :

Quand les premières lignes de défense sont altérées, une réponse inflammatoire orchestrée est mise en place afin de protéger l'hôte contre l'agent envahisseur. Cette réponse est tributaire de la reconnaissance des bactéries ou de leurs produits par les cellules de la première ligne de défense. Elle consiste en la sécrétion de cytokines qui attirent et activent les neutrophiles au site infectieux.

Les cytokines sont des protéines de poids moléculaire relativement faible (8 à 40 kDa) formées le plus souvent d'une seule chaîne polypeptidique et sont essentiellement impliquées dans l'inflammation et la réponse immunitaire (Dinarello C A., 2000). Parmi les cytokines, on distingue les cytokines chimio-attractantes ou chimiokines qui constituent une famille de petites protéines, de masse molaire comprise entre 8 et 12 kDa. Elles possèdent la capacité de recruter et d'activer les cellules circulantes sur les sites inflammatoires et donc de jouer un rôle prépondérant au cours des processus inflammatoires (Zlotnik A *et al*, 2000).

Il existe aujourd'hui plus de 44 chimiokines et 21 récepteurs de chimiokines décrits (Nelson PJ *et al*, 2001). La superfamille des chimiokines peut être divisée en 4 sous-familles (C, CC, CXC et CX₃C), selon la position des 2 premiers résidus de cystéine compris dans un motif de 4 Cystéines. Ces 2 cystéines peuvent être séparées par 1 ou 3 acides aminés (désignés par X) (Zlotnik A *et al*, 2000).

Au cours du processus inflammatoire, les cytokines capables de promouvoir l'inflammation sont dites pro-inflammatoires par opposition aux cytokines limitant cette réaction qui sont dites anti-inflammatoires (Dinarello C A., 2000). La réaction inflammatoire est ainsi contrôlée par une balance relative entre les cytokines pro-inflammatoires et les cytokines anti-inflammatoires (Benelli R *et al.*, 2006).

Dans ce projet de thèse, nous nous intéressons spécifiquement aux cytokines TNF- α , MIP-2 (macrophage inflammatory protein 2) et l'IL-6. Ces médiateurs pro-inflammatoires sont considérés comme les cytokines de la réponse précoce (early response cytokine).

III-1- TNF- α :

Le facteur de nécrose des tumeurs alpha ou TNF- α joue un rôle important dans la défense de l'hôte contre les infections et les tumeurs. Il médie les réponses inflammatoires et immunitaires, déclenche l'expression locale des chimiokines et cytokines et favorise l'adhésion, l'extravasation, l'attraction et l'activation des leucocytes au site de l'infection (Ruddle N.H., 1992).

De nombreuses cellules produisent le TNF- α . Les monocytes et les macrophages sont les principales sources de TNF- α (Takagi K *et al.*, 2005), mais il est produit également par les cellules dendritiques, les lymphocytes T et B, les cellules natural killer (NK), les neutrophiles, les mastocytes et les fibroblastes (Bazzoni and Beutler., 1996). Le TNF- α apparaît comme un médiateur essentiel dans l'inflammation; il provoque une augmentation de la phagocytose par les neutrophiles et l'augmentation de l'expression des antigènes de classe I et de classe II sur différents types cellulaires (Mueller R.B *et al.*, 2005).

III-1- MIP-2:

MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein-2) est une chimiokine ELR⁺ CXC majeure. Sa production est restreinte aux leucocytes inflammatoires incluant les neutrophiles et les monocytes. La production de MIP-2 au site inflammatoire augmente continuellement et atteint un pic entre 16 et 24 heures suite à une infection (Armstrong DA *et al.*, 2004). MIP-2 a été isolée pour la première fois à partir d'une lignée de macrophage murine (Raw 264.7) stimulée avec du LPS (Sherry B *et al.*, 1992 ; Tekamp-Olson P *et al.*, 1990).

MIP-2 est un agent chimiotactique très puissant pour les neutrophiles (Ramos C.D *et al.*, 2006), il est capable aussi de causer une réaction inflammatoire localisée quand il est injecté par voie sous-cutanée dans les membres inférieures de souris ou de rats (Saukkonen K *et al.*, 1989).

III-3- IL-6:

L'interleukine-6 (IL-6) a été identifiée pour la première fois en 1986 comme un facteur de régulation des cellules B et elle est reconnue maintenant comme un médiateur à fonctions pléiotropes. L'IL-6 possède des effets sur la maturation et l'activation des cellules B et T, les macrophages, les chondrocytes et les cellules endothéliales. L'IL-6 est produite par de

nombreux types cellulaires comprenant des cellules immunitaires comme les monocytes, les macrophages et les lymphocytes B et T ainsi que des cellules non immunitaires comme les kératinocytes, les fibroblastes, et les cellules endothéliales (Nishimoto N., 1989).

L'IL-6 est une cytokine qui induit la production de la plupart des protéines de l'inflammation aiguë (Gauldie J *et al.*, 1987). En association avec son récepteur soluble, l'IL-6 dirige la transition de la phase aiguë vers la phase chronique de l'inflammation en modifiant la nature de l'infiltrat cellulaire (remplacement progressif des neutrophiles par les monocytes) (Kaplanski G *et al.*, 2003).

Chapitre 3 : Le polynucléaire neutrophile

I- Description :

Le polynucléaire neutrophile (PNN), communément appelé neutrophile, est un leucocyte appartenant au sous-groupe des granulocytes. Il est caractérisé par son noyau polylobé et la présence de nombreux granules cytoplasmiques (Figure 17). La dénomination « neutrophile » provient du fait que les granules de ce polynucléaire ont la propriété de fixer les colorants neutres, alors que les granules du polynucléaire éosinophile fixent l'éosine et que ceux du polynucléaire basophile fixent les colorants basiques. Les neutrophiles constituent la plus importante population leucocytaire du sang circulant (60-70% des leucocytes sanguins) et représentent les principales cellules phagocytaires dans la circulation sanguine.

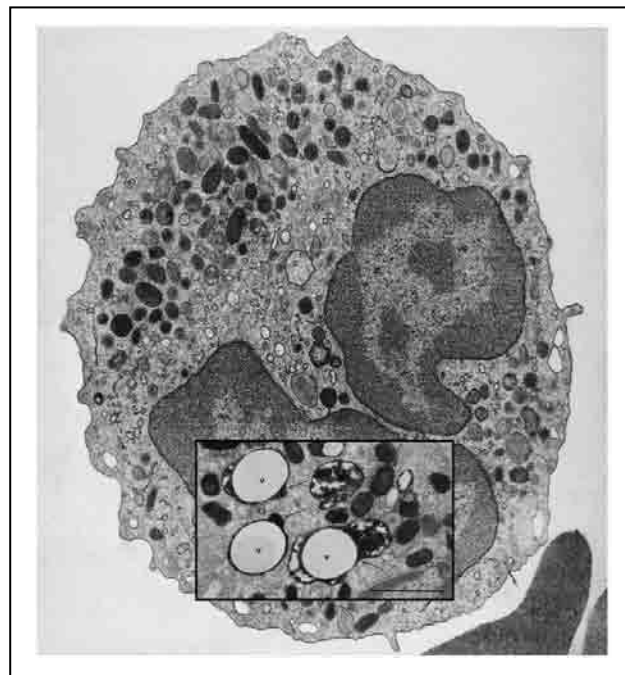


Figure 17 : Microscopie électronique d'un neutrophile humain

(Segal A.W., 2005)

Observation d'un neutrophile en microscopie électronique. L'encart montre le cytoplasme du neutrophile 20 secondes après la phagocytose d'une particule de latex opsonisée avec des IgG. (V : vacuole). Barre = 1µm.

II- Formation du neutrophile : hématoïèse :

Les neutrophiles sont issus de la différenciation et de la maturation de cellules souches pluripotentes de la moelle osseuse. Le développement et la maturation des granulocytes dans la moelle osseuse se produisent en deux phases : une phase mitotique et une phase non mitotique. Chacune d'elle dure approximativement une semaine.

Au cours de la phase mitotique, le premier précurseur, le myéloblaste, se différencie en promyélocyte, puis en myélocyte. A ce stade de développement de la lignée myéloïde, la prolifération des cellules par mitose prend fin et les myélocytes se différencient en cellules non segmentées (band cells) puis en cellules segmentées dans lesquelles apparaît un noyau multilobé et enfin en polynucléaire neutrophile (Figure 18). Ce processus de différenciation est régulé par des facteurs de croissance hématoïétique. Les neutrophiles passent par la suite dans la circulation sanguine, leur demi-vie est relativement courte : environ 12 heures.

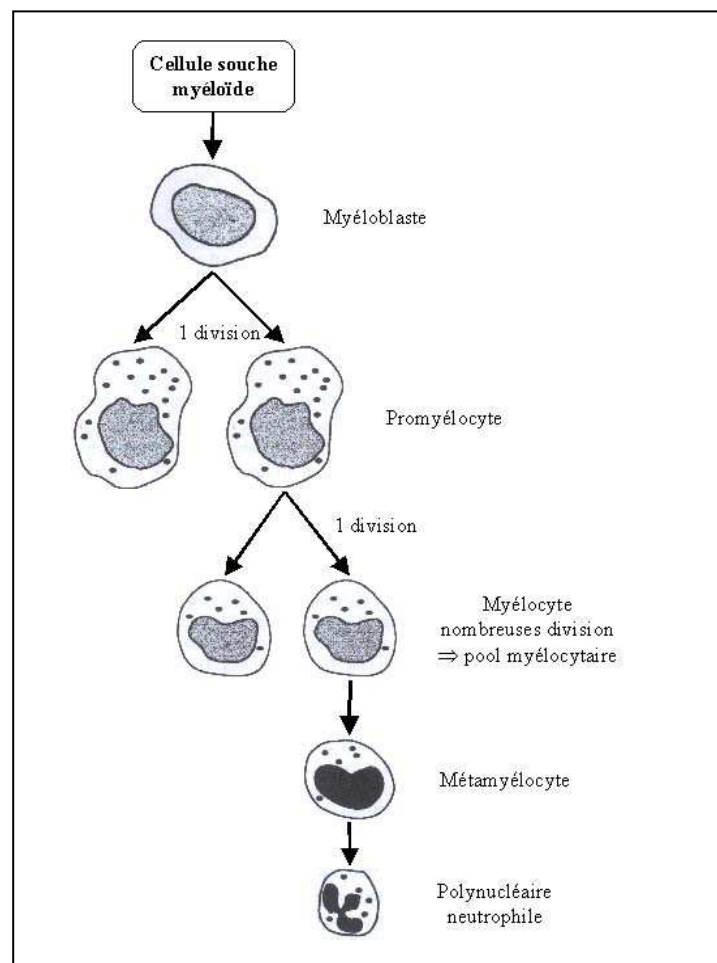


Figure 18 : Caractéristiques morphologiques du développement du neutrophile

III- Granules du neutrophile :

Les neutrophiles contiennent quatre types de granules : les granules azurophiles (ou primaires), les granules spécifiques (ou secondaires), les granules gélatinases (ou tertiaires) et les vésicules sécrétoires.

La formation de ces divers granules est initiée au stade précoce promyélocytaire de différenciation du neutrophile dans la moelle osseuse. Elles sont classées en fonction de leur contenu protéique et leur capacité à être exocytées après l'activation du neutrophile par un stimulus inflammatoire, phagocytose ou par des microorganismes invasifs (Figure 19) (Pham CT, 2006).

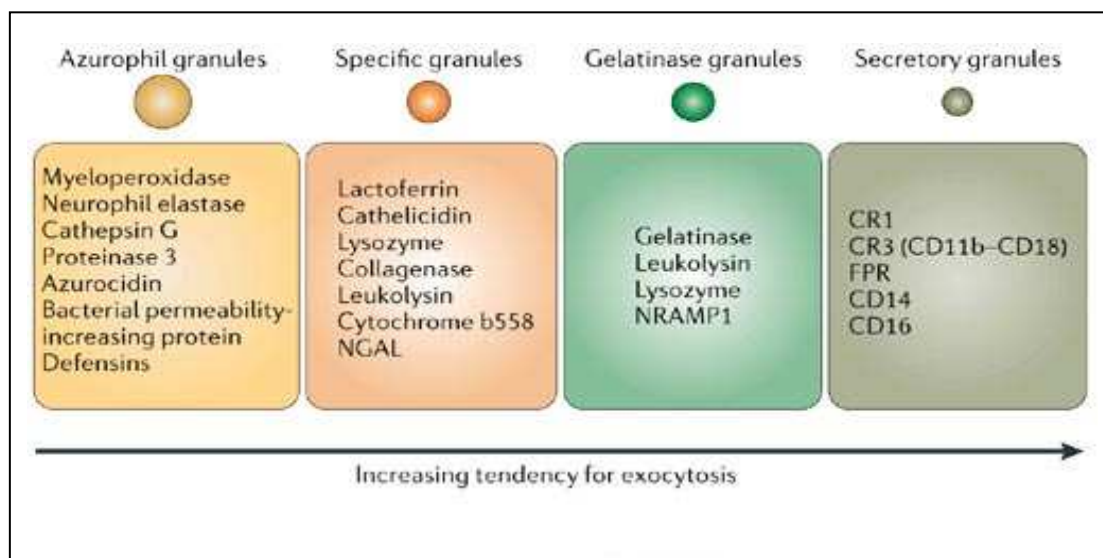


Figure 19 : Contenu des granules du neutrophile

(Pham C T. N., 2006)

Les granules azurophiles contribuent à la dégradation intracellulaire des microorganismes et à l'élimination du pathogène à l'intérieur du phagolysosome. Elles sont définies par leur haut contenu en myéloperoxydase (MPO), BPI (Bactericidal Permeability-Increasing Protein), défensines, l'azurocidine et les trois sérine-protéase : l'élastase du neutrophile (NE), la cathepsine G (CG) et la protéinase 3 (PR3) (Faurischou M, 2003). Ces sérine-protéase sont synthétisées sous forme de zymogènes et subissent une maturation par clivage protéolytique pour être stockées sous forme active dans les granules azurophiles. Les granules spécifiques sont dépourvus de peroxydase et sont concentrés en lactoferrine. Les granules gélatinases sont aussi dépourvus de peroxydase et contiennent de grandes quantités de gélatinase (d'où

leur nom) et peu de lactoferrine (Pham CT., 2006). Les granules ou vésicules sécrétoires contiennent l'albumine sérique et sont principalement des granules présentant un contenu protéique faible. Toutefois, elles fournissent un réservoir de composants membranaire (Segal A W *et al.*, 2005).

IV- Fonctions du neutrophile en réponse à une infection :

Les neutrophiles contribuent à la première ligne de défense de l'organisme contre tout pathogène (Nathan C, *et al* 2006). Quand une réponse inflammatoire est initiée, suite à des microorganismes infectieux, les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires recrutées au site inflammatoire (Tamas laskay, *et al.*, 2007).

Les différentes étapes impliquées dans la clairance d'un pathogène par les neutrophiles font intervenir, la migration du neutrophile, la phagocytose du pathogène, la dégranulation et la destruction de l'agent infectieux.

IV-1 Migration du neutrophile au site inflammatoire :

Le processus d'extravasation des neutrophiles peut être divisé en trois étapes : le roulement, l'arrêt et l'adhésion ferme à l'endothélium vasculaire, et la migration trans-endothéliale (Wagner JG *et al.*, 2000) (Figure 20).

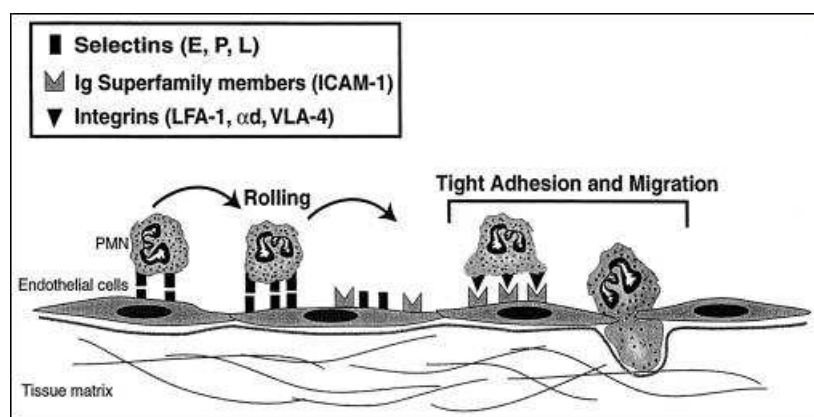


Figure 20 : Migration des neutrophiles

(Guo RF and Ward P., 2002)

La migration des neutrophiles se fait en 3 étapes: Roulement, adhésion ferme et migration trans-endothéliale.

IV-1-1 Roulement ou « rolling » :

L'initiation de la migration des neutrophiles commence par leur « capture » du sang périphérique et leur roulement tout au long de la paroi des vaisseaux. Ce processus implique l'adhésion des neutrophiles aux cellules endothéliales via des liaisons réversibles, de faible affinité, et leur migration depuis le sang périphérique jusqu'au site infectieux.

Ces liaisons mettent en jeu des molécules d'adhésion transmembranaires appelées sélectines (Albelda SM *et al.*, 1994 ; Luscinskas FW *et al.*, 1994). Les sélectines se localisent sur la plupart des cellules d'origine hématopoïétique et les cellules endothéliales du sang et de la lymphe.

Les L-Selectines (Leukocyte Selectin) sont exclusivement exprimées par les neutrophiles (Spertini O *et al.*, 1991). Les P-Selectines (Platelet Selectin) sont stockées dans les cellules endothéliales et les plaquettes et ne seront exprimées que suite à un stimulus inflammatoire (Malik A.B and Lo S.K., 1996). Les E-Selectin (Endothelial Cell Selectin) ne sont pas stockées dans les cellules endothéliales mais seule l'action des cytokines inflammatoire stimule la transcription des gènes correspondants (Scholz D *et al.*, 1996).

La coopération entre les L-Sélectines, responsables du roulement, à la surface des neutrophiles et les P-Sélectines, responsables de l'adhérence, exprimées à la surface des cellules endothéliales initie la migration trans-endothéliale des neutrophiles.

IV-1-2 Adhésion ferme :

L'initiation de la seconde étape de la migration des neutrophiles à savoir l'adhésion ferme met en place des interactions de forte affinité entre les intégrines activées à la surface des neutrophile et leurs ligands à la surface des cellules endothéliales (Williams MA *et al.*, 1999).

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques (une sous-unité α et une sous-unité β) exprimées par les cellules hématopoïétiques et les neutrophiles (Hynes RO, 1992).

L'adhérence des neutrophiles à l'endothélium est réalisée par les β 2-intégrines qui augmentent leur affinité et avidité pour leur ligand à la surface de l'endothélium. Cette interaction va stabiliser l'adhésion des neutrophiles sur l'endothélium, ils adhèrent alors fermement et s'arrêtent avant de franchir la barrière endothéliale et migrer dans les tissus jusqu'au site inflammatoire.

IV-1-3 Migration trans-endothéliale et franchissement de la membrane basale :

A la suite de leur arrêt sur l'endothélium, les neutrophiles vont migrer à travers la paroi des vaisseaux vers le tissu. Les neutrophiles activés expriment en abondance des récepteurs de chimioattractants à leur surface et vont alors se déplacer dans le sens de ces chimioattractants. Les chimioattractants et les chimiokines des neutrophiles sont produits par une large variété de cellules incluant les macrophages, les monocytes, les lymphocytes, les plaquettes, les neutrophiles et les cellules parenchymateuses (Furie MB *et al.*, 1995).

Suite à des stimuli chimiotactiques, les neutrophiles expriment au moins cinq récepteurs. Des récepteurs uniques existent pour PAF (Platelet-activating factor) un phosphoglycéride acéylé dérivé des lipides des membranes cellulaires, C5a, des protéines du complément, LTB₄ (leukotrienne B₄) et le peptide bactérien fMLP (Formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine) (Wagner JG *et al.*, 2000).

IV-2 Phagocytose, dégranulation et élimination du pathogène :

IV-2-1 Phagocytose :

La phagocytose consiste en la reconnaissance, l'ingestion et la digestion de grosses molécules et de micro-organismes étrangers afin de limiter l'invasion du tissu sain (Savill J.S *et al.*, 1989). Le neutrophile possède deux types de récepteurs spécialisés dans la reconnaissance du pathogène préalablement opsonisé par des anticorps ou des fragments du complément.

Les premiers récepteurs d'opsonines du neutrophile sont les récepteurs des fragments constants des immunoglobulines de type IgG (FcγR) qui reconnaissent les fragments constants libres des anticorps fixés par leur partie variable au corps étranger (Middelhoven P J *et al.*, 1997). Les seconds récepteurs d'opsonine du neutrophile sont les récepteurs du complément (CR) qui se lient aux particules recouvertes de fragments du complément. Les principaux récepteurs phagocytaires chez le neutrophile humain sont les récepteurs FcγR de type II : FcγRIIA (CD32) et les récepteurs du complément CR3 alors que les récepteurs FcγR de type III : FcγR IIIB (CD16) et CR1 (CD35) jouent le rôle de co-récepteurs facilitant la fonction des premiers (Witko-Sarsat V *et al.*, 2000).

A la suite de la reconnaissance du corps étranger, les neutrophiles l'internalisent et amorcent divers mécanismes qui vont aboutir à la destruction des particules englobées. L'efficacité antimicrobienne des neutrophiles humains dépend donc de deux événements qui se

produisent au niveau du phagolysosome des neutrophiles stimulés : la génération d'espèces réactives d'oxygène (ROS) suite à l'activation de la NADPH oxydase et la déviation du contenu enzymatique et protéique des granules dans le phagolysosome (Witko-Sarsat V *et al.*, 2000).

IV-2-2 Dégranulation :

La dégranulation est la libération du contenu des granules du neutrophile dans le phagolysosome ou dans le milieu extracellulaire. Il s'agit d'un événement clé de l'activité microbienne du neutrophile (Mocsai A *et al.*, 1999).

IV-2-3 Elimination du pathogène :

Les phagolysosomes ont un rôle clé dans le processus microbicide parce qu'ils constituent un espace fermé dans lequel les microbes ingérés sont exposés à des substances toxiques, ce qui limite les dégâts tissulaires. La séquestration intracellulaire des microorganismes induit la fusion des granules du neutrophile avec le phagolysosome et le relargage des peptides antimicrobiens et des protéases des granules dans le phagolysosome. L'action de ces peptides et de ces protéases constitue le **mécanisme non oxydatif** de la fonction bactéricide du neutrophile.

Le deuxième mécanisme de la fonction bactéricide du neutrophile appelé également **mécanisme oxydatif** active le système NADPH oxydase. Ce système génère de grandes quantités d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui sont libérées à l'intérieur du phagolysosome. L'activation du métabolisme oxydatif, connu sous le nom d'explosion respiratoire, implique en premier lieu la NADPH oxydase ; il s'agit d'un complexe enzymatique composé de protéines cytosoliques (p40phox, p47phox et p67phox) et de protéines membranaires (p22phox et gp91phox) constituant ainsi un hétérodimère connu sous le nom de cytochrome b558 (Babior B.M, 1999 ; Clark R.A, 1999). Lors de l'activation des neutrophiles, p47phox est phosphorylé et les composants cytosoliques migrent à la membrane plasmique où ils s'associent avec le cytochrome b558 pour former une oxydase active. Ce complexe enzymatique est donc capable de générer des anions superoxydes ($O_2^{\cdot -}$) qui se convertissent en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Babior, 1984 ; Nathan, 1987). Il y a trois intermédiaires dans la réduction de l' O_2 en H_2O_2 : $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 et le radical hydroxyle (OH^{\cdot}). La génération des anions superoxydes par l'activation de la NADPH oxydase est le point de départ de la production d'un grand nombre d'oxydants réactifs comprenant les oxydants

halogénés générés à travers la signalisation MPO. La MPO (myéloperoxydase) est une protéine présente dans les granules azurophiles des neutrophiles et des monocytes. Cette enzyme est sécrétée dans le phagolysosome ou dans l'espace extracellulaire suite à une activation cellulaire. La MPO amplifie le potentiel toxique de H_2O_2 en produisant des intermédiaires réactifs, principalement l'acide hypochloreux (HOCl), agent très toxique (Figure 21).

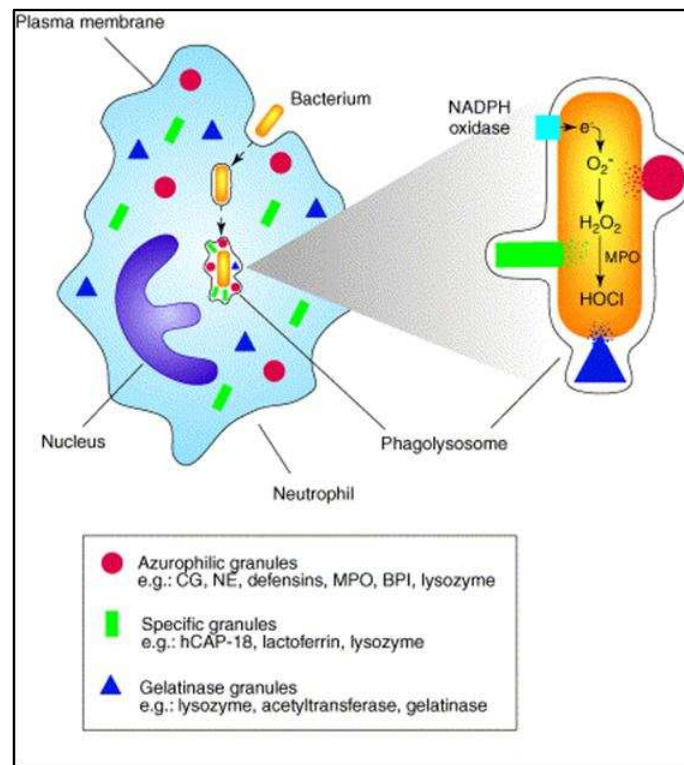


Figure 21 : Schéma représentatif du mécanisme oxydatif et non oxydatif d'un neutrophile ayant phagocyté une bactérie

(Mayer-Scholl A *et al.*, 2004)

Le mécanisme non oxydatif du neutrophile met en jeu le contenu des granules azurophiles, spécifiques et gélatinases contenant des sérine-protéase, des protéines et des peptides antimicrobiens ainsi que des enzymes. Le mécanisme oxydatif repose sur le complexe NADPH oxydase qui s'assemble à la membrane du phagolysosome et produit $O_2^{\bullet -}$ qui se convertit en H_2O_2 . La MPO produit le HOCl à partir du H_2O_2 .

V- Elastase du neutrophile (NE) :

L'élastase (NE) comme la cathepsine G (CG) et la protéase 3 (PR3) sont principalement exprimées par le neutrophile. Ces trois enzymes appartiennent à la famille de sérine protéases et possèdent un fort degré d'homologie (au niveau de l'ADNc et des protéines) avec les granzymes des lymphocytes T cytotoxiques (CTL) et les chymases et tryptases des mastocytes. Les sérine-protéase humaines et murines contiennent, dans une triade catalytique bien conservée, l'histidine, l'acide aspartique et des résidus de sérine (Caughey G H *et al.*, 1993 ; Heusel J W *et al.*, 1993).

V-1 Le gène de la NE :

Chez l'homme, le gène codant la NE est localisée sur le bras court du chromosome 19, il possède une taille de 4 Kb et est organisé en cinq exons et quatre introns (Takahashi H *et al.*, 1988). Chez la souris ce gène est localisé sur le chromosome 10, il possède une taille de 1,7 Kb et est organisé aussi en 5 exons (similaires et identiques à ceux de l'homme) et 4 introns (Belaouaj A *et al.*, 1997) (Figure 22).

Chez l'homme, le gène de la NE forme un cluster avec le gène codant la PR3 et l'azurocidine (AZU), une sérine protéase inactive qui possède des activités chimiotactiques et bactéricides. Contrairement à l'homme, la souris n'exprime pas l'azurocidine (Chertov O *et al.*, 1997).

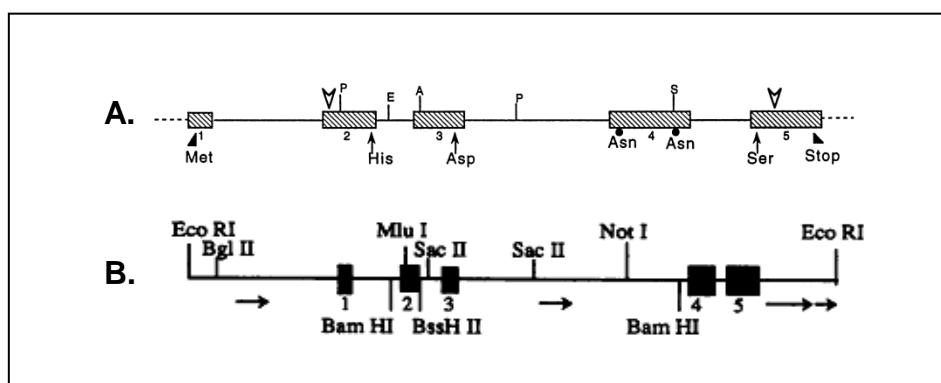


Figure 22 : Organisation des gènes humains et murins de la NE

A. Organisation en introns et exons du gène murin de la NE. 1, 2, 3, 4 et 5 représentent les exons (Belaouaj A *et al.*, 1997). B. Organisation du gène humain de la NE. 1, 2, 3, 4 et 5 représentent des exons (Zimmer M *et al.*, 1992).

V-2 La protéine NE :

V-2-1 Synthèse et stockage:

La NE est synthétisée sous forme d'un précurseur (zymogène) de 267 acides aminés et subit deux phases de maturation au cours de la différenciation du neutrophile pour être stockée sous forme active dans les granules azurophiles avec la CG et la PR3. Le niveau le plus élevé d'expression des ARNms codant la NE se situe au stade promyélocytaire de la différenciation (Garwicz D *et al.*, 2005).

Peu après sa synthèse, la forme zymogène subit une phase de maturation puis d'adressage dans les granules azurophiles. La maturation de la proforme débute par un clivage du côté N-terminal, libérant un peptide signal de 27 résidus. Il reste à cette extrémité une pro-séquence formée de 2 résidus qui est retirée par l'action de la dipeptidyl peptidase I (DPPI) appelée aussi cathepsine C (Adkison A.M *et al.*, 2002). Le clivage de ces résidus n'est pas essentiel pour l'adressage de la NE au granule azurophile mais il est indispensable pour son activité enzymatique. La maturation de l'extrémité N-terminale est essentielle au stockage optimal de la NE dans les granules azurophiles. En absence de DPPI, les proformes sont sécrétées de façon constitutive (Garwicz D *et al.*, 2005) ou dégradées plus facilement comme cela a été montré pour la proforme de granzyme A (une sérine protéase sécrétée par les lymphocytes T cytotoxiques) (Pham and Ley, 1999). La proforme subit ensuite le clivage d'une séquence à l'extrémité C-terminale de 19 résidus (Salvesen G and Enghid J.J, 1990) dont le dysfonctionnement peut affecter le transport des protéases du Golgi aux granules azurophiles (Horwitz M *et al.*, 2004 ; Gullberg *et al.*, 1995) (Figure 23).

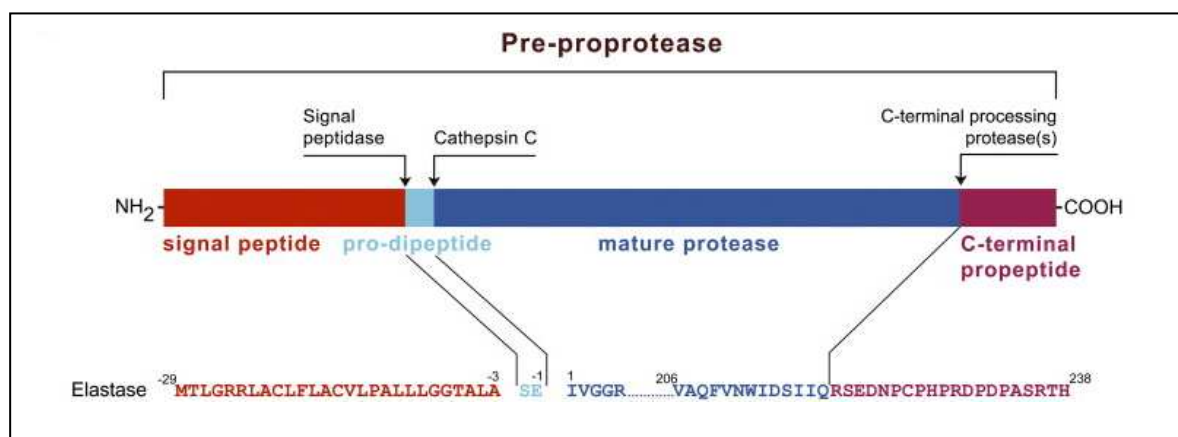


Figure 23 : Processus de maturation de la NE humaine

(Korkmaz B *et al.*, 2008)

Cette phase de maturation de la proforme de l'élastase révèle un site d'interaction avec une protéine particulière, l'AP3 (Adaptator Protein 3), qui permet le transfert de la protéase de l'appareil de Golgi aux granules azurophiles. Sans cette phase de maturation de l'extrémité C-terminale, l'interaction avec la protéine AP3 ne se fait pas et l'élastase est adressée à la membrane plasmique où elle occupe une position trans-membranaire (Benson K.F *et al.*, 2003) (Figure 24).

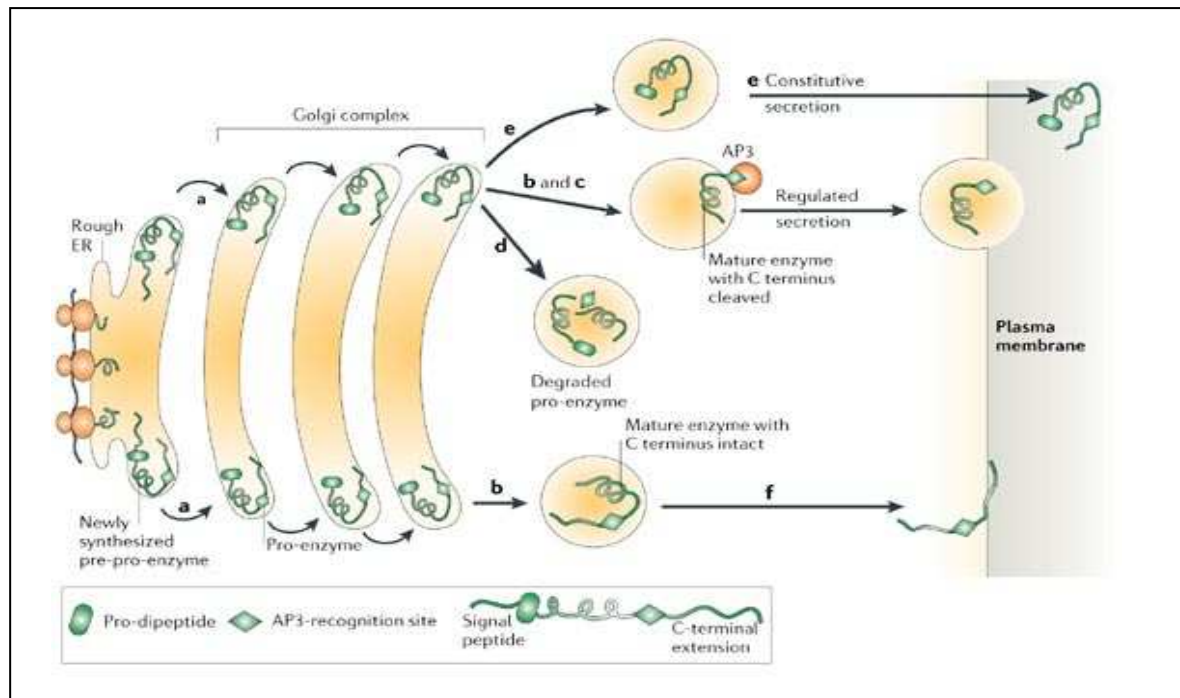


Figure 24: Biologie des sérine-protéase du neutrophile

(Pham C T. N., 2006)

V-2-2 Caractéristiques biochimiques:

La NE est stockée sous forme mature de 30 kDa (218 acides aminés) dans les granules et est libérée dans l'environnement extracellulaire avec les deux autres sérine-protéase lorsque le neutrophile est exposé à des stimuli inflammatoires. La structure de la forme mature est stabilisée par des ponts disulfures et comporte des motifs N-glycosidiques dont la nature variable permet la différenciation des trois isoformes de la NE (Watorek *et al.*, 1993). L'abondance de résidus basiques par rapport aux résidus acides confère à la protéase un caractère fortement basique (pHi >9).

La NE est inactive dans les granules en raison du pH intragranulaire acide et du fait de son association à des protéoglycanes chargés négativement comme la serglycine (Niemann C.U *et al*, 2004 ; Reeves *et al*, 2002). Le pH plus élevé dans le milieu extracellulaire ou dans le phagolysosome ainsi que la dissociation des complexes par des mécanismes dépendant du flux K^+ permettraient de révéler son activité protéolytique (Reeves E.Pet *al.*, 2002).

L'enzyme mature est une glycoprotéine extrêmement cationique avec un point isoélectrique très basique (pI 10-11) (Kortamaz B *et al.*, 2008) (Figure 25).

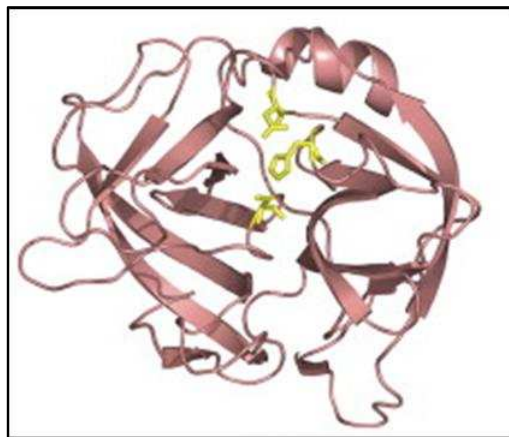


Figure 25 : Structure tridimensionnelle de l'élastase humaine du neutrophile

(Korkmaz B *et al.*, 2008).

Les résidus de la triade catalytique apparaissent en jaune.

V-3 Substrats de la NE :

La NE est une enzyme puissante capable de dégrader différents substrats (Tableau III). L'activité enzymatique de cette protéase réside en sa triade catalytique His⁵⁷- Asp¹⁰²- Ser¹⁹⁵ où la Serine représente le résidu nucléophile (Belaouaj A *et al.*, 2002).

L'enzyme digère différents substrats protéiques par clivage principalement de liaisons -Val-X-, -Ala-X-, -Leu-X-, et Met-X-.

Plusieurs études, surtout *in vitro*, ont montré que la NE peut cibler les récepteurs membranaires, les médiateurs inflammatoires, les immunoglobulines, et les facteurs de coagulation.

La NE dégrade également l'élastine, la fibronectine, la laminine, le collagène de type I et IV, les protéoglycanes, les récepteurs plaquettaire IIb/IIIa, les récepteurs du complément, la

thrombomoduline, les protéines du surfactant, les cadhérines ainsi qu'une variété de protéines plasmatiques (Havemann K and Gramse M, 1984 ; Cadren D *et al.*, 1998 ; Ginzberg H.H *et al.*, 2001; Abe H *et al.*, 1994 ; Liou T.G *et al.*, 1996).

D'autres études, ont montré que la NE est capable de dégrader les facteurs de virulence bactériens ainsi que les protéines de structure responsables du maintien de l'intégrité du pathogène envahisseur.

Tableau III : Substrats de la NE

Sérine protéase	Substrats	Références
NE	Elastine et autres composants de la matrice extracellulaire	Bank U <i>et al.</i> , 2001
	Protéines plasmatiques	Allen D.H <i>et al.</i> , 1995 Taylor J.C <i>et al.</i> , 1977 Turkingston P.T <i>et al.</i> , 1991
	Médiateurs Inflammatoires	Bank U <i>et al.</i> , 2001
	Protéines du Surfactant	Hirche T.O <i>et al.</i> , 2004
	OmpA chez <i>E. coli</i>	Belaouaj A <i>et al.</i> , 2000
	OprF chez <i>P. aeruginosa</i>	Hirche T.O <i>et al.</i> , 2008
	Chimiokines :	
	CCL3	Ryu O.H <i>et al.</i> , 2005
	CCL23	Miao Z <i>et al.</i> , 2007
	CXCL12	Rao R.M <i>et al.</i> , 2004
	Cytokines :	
	IL-6	Bank U <i>et al.</i> , 2000
	IL-18	Robertson S.E <i>et al.</i> , 2006
	Facteurs de croissance :	
	TGF- β	Lee K.Y <i>et al.</i> , 2006
	Récepteurs :	
	α II β integrin	Si-Tahar M <i>et al.</i> , 1997

CD14	Le-Barillec K <i>et al.</i> , 1999
CD43	Remold-O'Donnel E., & Parent, D., 1995
CD87	Beaufort N <i>et al.</i> , 2004
CR1	Sadallah S <i>et al.</i> , 1999
CXCR4	Delgado MB <i>et al.</i> , 2001
PAR1	Renesto P <i>et al.</i> , 1997
PAR2	Dulon S <i>et al.</i> , 2003
TLR4	Devaney J. M <i>et al.</i> , 2003
TNFR	Porteu F <i>et al.</i> , 1991
Molécules d'adhésion :	
Cadhérines E	Mayerle J <i>et al.</i> , 2005
ICAM-I	Champagne B <i>et al.</i> , 1998
VCAM-I	Levesque J.P <i>et al.</i> , 2001
Molécules apoptotiques :	
NF- κ B	Preston G.A <i>et al.</i> , 2002

V-4 Rôle antimicrobien de la NE :

La NE est directement impliquée dans le processus d'élimination des pathogènes par les neutrophiles. Suite à l'ingestion d'un microorganisme, la NE et d'autres constituants des granules du neutrophile sont relargués à l'intérieur du phagolysosome et entourent le microorganisme (Belaouaj A *et al.*, 2000). Cependant, peu d'études ont montré que la NE possède des activités antibactériennes. En effet, la NE peut lyser la paroi des bactéries tuées par la chaleur (Odeberg H *et al.*, 1976). Aussi, et suite à l'utilisation de neutrophiles vivants ou des extraits de leurs granules, il a été montré que la NE participe à la digestion des bactéries phagocytées. Toutes ces études ne déterminent pas si la NE possède un effet bactéricide ou bactériostatique. Bien que les activités antibactériennes des molécules des granules du neutrophile aient été étudiées *in vitro*, les conditions expérimentales ne reflètent pas l'environnement du neutrophile et le milieu *in vivo*.

Ainsi, des études utilisant les mutations génétiques ciblant la NE du neutrophile ont montré que les souris déficientes en NE (NE^{-/-}) présentent des défenses immunitaires altérées contre les infections à *Escherichia coli* (*E. coli*) et *Klebsiella pneumoniae* (Belaouaj *et al.*, 1998).

De plus, la NE contribue à l'activité antifongique du neutrophile contre *Candida albicans* et *Aspergillus fumigatus* (Reeves E.P *et al.*, 2002 ; Tkalcevic J *et al.*, 2000).

La NE tue *E. coli* en dégradant la protéine A de sa membrane externe (OmpA) (Belaouaj A *et al.*, 2000) et clive la porine majeure F de la membrane externe chez *P. aeruginosa* (Hirche T.O *et al.*, 2008). De plus la NE clive les facteurs de virulence des entérobactéries *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri* et *Yersinia enterocolitica* (Weinrauch Y *et al.*, 2002).

La NE possède une activité bactéricide extracellulaire seule ou en association avec la CG et la PR3. L'association de ces sérine-protéase, excrétées dans le milieu extracellulaire, avec la chromatine du neutrophile forme les NETs (Neutrophil Extracellular Traps) capables de piéger les bactéries à Gram positif et les bactéries à Gram négatif (Brinkmann V *et al.*, 2004 ; Brinkmann v & Zychlinsky A, 2007). Les NETs permettent ainsi aux neutrophiles de sécréter de fortes concentrations de protéases, de dégrader les facteurs de virulence et de tuer les bactéries dans le milieu extracellulaire.

V-5 Rôle de l'élastase dans la modulation de l'expression des cytokines et chimiokines :

En plus de ses activités bactéricides, la NE possède des propriétés de régulation de la réponse inflammatoire locale. Elle peut moduler les fonctions biologiques telles que la signalisation cellulaire en agissant sur l'expression des cytokines et des chimiokines et en activant spécifiquement certains récepteurs cellulaires (Pham TN, 2006).

Plusieurs études ont montré que les sérine-protéase du neutrophile (NSP) modifient protéolytiquement l'activité de différentes chimiokines et fournissent un mécanisme alternatif à la conversion des précurseurs des cytokines dans leur forme native.

La CG et la NE modifient la prochemerine en chemerine active, un facteur chimiotactique, à travers le clivage de son peptide du côté C-terminal (Wittamer V *et al.*, 2005). La NE et la CG humaines clivent par un épissage alternatif CCL23 des deux côtés C et N terminaux, produisant une chimiokine CC pouvant engager, avec une haute affinité, deux récepteurs différents des chimiokines (Miao Z *et al.*, 2007).

En revanche, plusieurs études ont montré que le clivage protéolytique des chimiokines par les sérine-protéase peut résulter en une diminution de leur activité. En effet la CG digère CCL5

(connue aussi sous le nom de RANTES) en un peptide délétère de trois résidus N-terminaux et montrant une activité chimiotactique diminuée (Lim J.K *et al.*, 2006).

Il faut noter que l'ensemble de ces résultats découle des études *in vitro*. L'importance de ces observations en situations physiologiques et physiopathologiques reste à définir.

V-6 Inhibiteurs physiologiques endogènes de la NE :

L' α 1-protéinase inhibitor (α 1-PI), le SLPI (Secretory Leucocyte Peptidase Inhibitor) et l'élafine sont des inhibiteurs physiologiques de la NE. Ils s'opposent à l'activité extracellulaire et excessive de l'enzyme (Fitch PM *et al.*, 2006).

Les inhibiteurs des sérine-protéase constituent un groupe de molécules pléiotropiques capables de limiter l'effet délétère des protéases de l'hôte ainsi que celui des pathogènes.

L' α 1-PI est un inhibiteur systémique typique de plusieurs sérine-protéase incluant la PR3, la CG et cible principalement la NE. Cet inhibiteur inactive la NE en s'y attachant de façon covalente et permanente (Dobo J *et al.*, 2004). Il inhibe approximativement 92% de la NE dans le sérum, le reste de l'inhibition est assuré par l' α 2-macroglobuline (α 2-M) qui est également un inhibiteur systémique. L' α 2-M bloque en partie l'activité de la NE à travers une obstruction structurale d'une fraction protéique de la sérine protéase (Moore AR *et al.*, 1999). Le SLPI inhibe principalement la NE via son extrémité C-terminale (Kido H *et al.*, 1999). L'extrémité N-terminale du SLPI est hautement cationique et possède une activité antimicrobienne directe capable de perturber la membrane cellulaire de *P. aeruginosa*, d'*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, le groupe A des *Streptococcus*, les champignons : *Aspergillus fumigatus* et *Candida albicans* (Williams S E *et al.*, 2006).

L'élafine inhibe les protéases à travers son domaine C-terminal, la NE est son substrat principal (Simpson AJ *et al.*, 1999). L'élafine partage beaucoup de caractéristiques fonctionnelles avec le SLPI telle que l'activité antimicrobienne contre les bactéries à Gram négatif et les bactéries à Gram positif (Hiemstra PS *et al.*, 1996).

V-7 Effet délétère de la NE :

En plus de sa fonction physiologique antimicrobienne, la NE est reconnue comme l'une des enzymes les plus destructives de l'organisme. Elle est capable d'échapper à la régulation des différents inhibiteurs de protéases au niveau du site inflammatoire et de causer par conséquent des lésions pulmonaires (Kawabata K *et al.*, 2002). La NE joue un rôle important

dans la physiopathologie des lésions pulmonaires aiguës. Il existe une corrélation positive entre sa concentration, la sévérité de la maladie (Rocker G M *et al.*, 1988), l'index respiratoire (Donnelly S C *et al.*, 1995) et la défaillance du poumon (Tonz M *et al.*, 1995).

Les lésions pulmonaires aiguës résultent d'une infection de bactéries à Gram négatif. La forme la plus sévère du syndrome de détresse respiratoire chez l'adulte est une maladie très mortelle résistant à plusieurs thérapies. Les caractéristiques physiopathologiques de cette maladie incluent un œdème alvéolaire et interstitiel associé à une large infiltration de neutrophiles dans l'espace alvéolaire (Wiener-Kronish J.P *et al.*, 1990).

V-8 Mécanismes d'échappement de la NE aux inhibiteurs de protéases endogènes :

La fonction physiologique des inhibiteurs endogènes des sérine-protéase du neutrophile est d'empêcher la NE d'induire des lésions tissulaires et d'endommager les poumons. Malgré ce mécanisme de contrôle au niveau du site inflammatoire, la NE est capable d'échapper à la régulation des antiprotéases selon différentes manières. D'abord, du fait de leur haut poids moléculaire, les inhibiteurs de protéases ne peuvent pas accéder au microenvironnement inflammatoire entre les neutrophiles et la NE. D'autre part, l' α 1-PI peut être inactivé à travers l'oxydation de son centre catalytique (Méthionine en position 358) par les espèces réactives de l'oxygène dérivées des neutrophiles activés (Matheson N.R *et al.*, 1979). Il a été démontré que ce mécanisme inactive également l' α 2-M et le SLPI (Weiss S.J *et al.*, 1989 ; Kramps J.A *et al.*, 1987). Enfin, le troisième mécanisme d'échappement de l'élastase consiste en la non efficacité « totale » des inhibiteurs endogènes contre la NE liée au tissu (Kawabata K *et al.*, 1996) et à la surface des neutrophiles (Owen C.A *et al.*, 1995). Ce dernier mécanisme est cependant controversé. En effet, des travaux récents ont montré que l' α 1-PI est capable d'inhiber la NE liée à la surface du neutrophile (Korkmaz B *et al.*, 2005). En outre, il a été montré que les inhibiteurs endogènes de protéases de faibles poids moléculaires sont parfaitement efficaces contre la NE libre et liée au tissu.

V-9 Génération de souris déficientes en l'élastase du neutrophile :

Les souris déficientes en NE ou souris NE^{-/-} ont été établies par mutagenèse dirigée (Belaouaj A *et al.*, 1998).

La distribution génique du gène murin de la NE a été modifiée en créant une mutation qui remplace l'exon n°2 par l'ADN_C de la néomycine phosphotransférase. Cet ADN_C possède le

promoteur de la phosphoglycérate kinase (PGK-neo) comme marqueur de sélection du locus $NE^{-/-}$ (Figure 26). Les souris déficientes en l'élastase du neutrophile ($NE^{-/-}$) ont été générées par transmission des clones de cellules embryonnaires (129/Sv) portant la mutation à la lignée germinale.

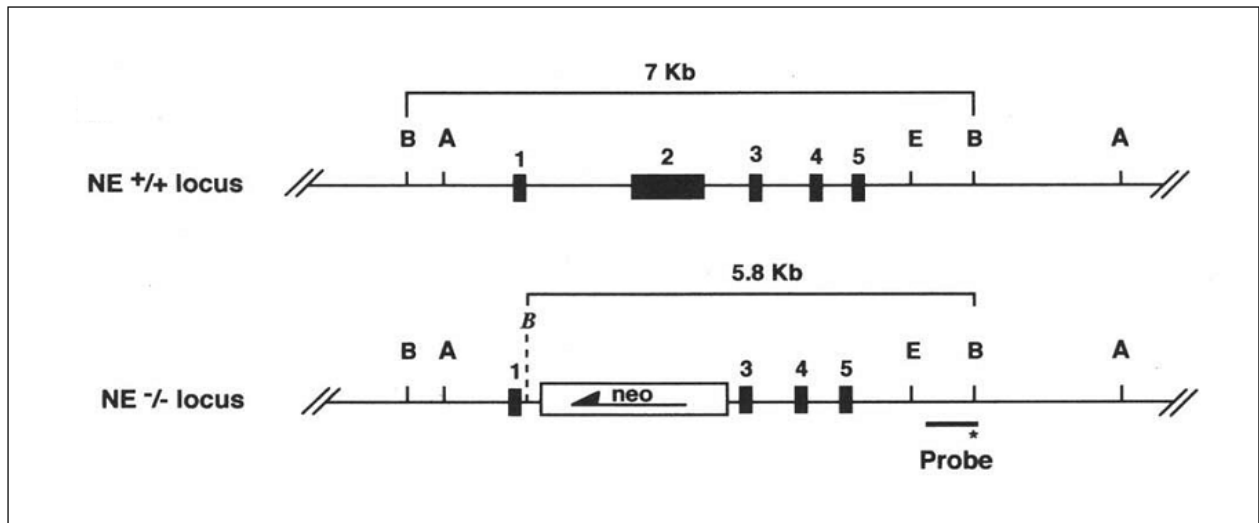


Figure 26: Mutagenèse dirigée du gène murin de l'élastase

(Belaouaj A *et al*, 1998).

La disponibilité de souris déficientes en NE est d'une importance majeure. En effet, l'exposition de ces souris à différents modèles inflammatoires et lésionnels mimant les pathologies humaines nous renseignera sur le rôle physiologique (articles 1 et 2 de la thèse) et la contribution de cette enzyme dans la genèse des processus inflammatoires et lésionnels (article en préparation).

Objectifs

La réponse innée à l'infection bactérienne est caractérisée par le recrutement et l'accumulation des polynucléaires neutrophiles (PNNs) dans le site infecté. C'est le cas par exemple des poumons infectés par *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) chez les patients atteints de pneumonies aigües. Il est admis aussi que la fonction majeure des PNNs est de tuer l'agent infectieux à l'intérieur du phagolysosome et de limiter l'inflammation que ce dernier provoque. Pour se faire, le PNN utilise différentes molécules antimicrobiennes telle que l'élastase du neutrophile (NE). Cependant, le rôle, le mécanisme antibactérien de la NE dans la lutte contre l'infection pulmonaire par *P. aeruginosa* et sa contribution à la modulation de la réaction inflammatoire n'ont pas été élucidés.

Notre objectif principal dans ce travail est de caractériser le rôle de la NE dans la protection de l'hôte contre l'infection bactérienne à *P. aeruginosa*, d'appréhender son mécanisme antibactérien et d'étudier le mécanisme de son implication dans la régulation de l'inflammation à savoir la modulation de l'expression des chimiokines et cytokines pro-inflammatoires.

Dans la première partie de l'étude « *in vivo* », nous évaluons la survie des souris WT et NE^{-/-} suite à une infection intra-nasale par *P. aeruginosa*, ainsi que la capacité des souris à éliminer le pathogène. Les fonctions antibactériennes des neutrophiles et le rôle bactéricide de la NE sont ensuite analysés. Enfin, nous identifions le mécanisme antibactérien de la NE.

Pour cela, nous avons développé un modèle murin d'infection pulmonaire aigüe à *P. aeruginosa*. Les souris utilisées sont des souris sauvages (WT) et des souris déficientes en NE (NE^{-/-}) (Belaouaj A *et al.*, 1998). Les souches de *P. aeruginosa* utilisées sont respectivement la souche de référence H103 et le mutant isogénique déficient en OprF H636.

Dans la deuxième partie de l'étude « *in vitro* » et « *ex vivo* », nous analysons d'abord l'expression des cytokines et chimiokines dans les LBA de souris WT et NE^{-/-} infectées avec *P. aeruginosa*. Ensuite, nous déterminons le niveau de régulation de ces cytokines par la NE. Enfin, nous étudions l'effet de la NE sur la modulation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires et chimiokines chez les macrophages avant de déterminer le récepteur ciblé par la NE qui contribue à cette régulation.

La lignée cellulaire utilisée sont des macrophages de souris : les J774. Ces cellules ont été développées dans le laboratoire de Jeffrey A Whitsett (Wikenheiser K A *et al.*, 1993).

L'étude a également été réalisée sur des macrophages murins *ex vivo*. Ces macrophages sont issus du péritoine de souris préalablement injectées avec du thioglycolate (Gangloff S C *et al.*, 1999 ; Grandjean-Laquerriere A *et al.*, 2007). Deux types de souris ont été utilisées dans notre étude: des souris sauvages (C3H/HeN) et de souris possédant un récepteur TLR4 non fonctionnel (C3H/HeJ).

Résultats

Article 1

Neutrophil Elastase Mediates Innate Host Protection against *Pseudomonas aeruginosa*

Tim O. Hirche ³, **Rym Benabid** ³, Gaetan Deslee, Sophie Gangloff, Samuel Achilefu, Moncef Guenounou, François Lebargy, Robert E. Hancock, and
Azzaq Belaoaouaj

³ T.O.H and R.B. contributed equally to this paper

J Immunol. 2008 Oct 1 ; 181 (7) : 4945-54

L'élastase du neutrophile médie la protection de l'hôte contre *Pseudomonas aeruginosa*

À la suite d'une infection pulmonaire par *P. aeruginosa*, les neutrophiles sont les premières cellules phagocytaires recrutées au site inflammatoire (Mizgerd J.P., 2008).

Deux types de mécanismes sont alors mis en place par les neutrophiles pour éliminer les microorganismes pathogènes : un mécanisme oxydatif (Hampton M.B *et al.*, 1998) et un mécanisme non oxydatif (Ganz T *et al.*, 1999). Ces deux systèmes font intervenir différentes molécules contenues dans les granules du neutrophile.

Parmi les molécules du système non oxydatif, on trouve notamment 3 sérine-protéase, à savoir la NE, la PR3 et la CG. Ces sérine-protéase agissent en altérant l'intégrité structurale des bactéries. La NE mature est une glycoprotéine cationique stockée dans les granules azurophiles du neutrophile à une concentration de l'ordre du millimolaire ce qui en fait un composant majeur des neutrophiles (Liou T *et al.*, 1996).

La NE est cruciale pour la défense de l'hôte contre les bactéries à Gram négatif. Elle peut activer ou générer des peptides antibactériens et/ou tuer directement les bactéries en agissant comme un antibiotique. Notre équipe a précédemment montré le rôle important de la NE dans la défense de l'hôte contre les bactéries à Gram négatif (*Klebsiella pneumoniae* et *Escherichia coli*). Curieusement, aucun effet de la NE sur les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus*) n'a été constaté (Belaouaj A *et al.*, 1998). Ces travaux montrent en effet que les souris déficientes en NE (NE^{-/-}) sont plus susceptibles que les souris sauvages (WT) à une infection intrapéritonéale avec des bactéries à Gram négatif, tandis qu'aucune différence de susceptibilité n'est constatée avec des bactéries à Gram positif. Notre groupe a également démontré que pour éliminer efficacement *Escherichia coli* et *Klebsiella pneumoniae*, NE emploie son activité catalytique pour dégrader la protéine majeure A de la paroi externe (OmpA : Outer membrane protein A). OmpA joue un rôle très important dans le maintien de l'intégrité des bactéries (Belaouaj A *et al.*, 2000). Cependant, le rôle de la NE ainsi que sa contribution relative dans la lutte contre *P. aeruginosa* n'ont pas été définis.

Dans cette étude nous avons tout d'abord développé un modèle murin d'infection pulmonaire aiguë avec *P. aeruginosa* afin d'analyser l'effet du pathogène sur la mortalité et la morbidité de deux génotypes de souris : les souris sauvages (WT) et les souris déficientes en NE

(NE^{-/-}). Ensuite, nous avons analysé l'activité bactéricide directe de la NE et des neutrophiles WT et NE^{-/-} sur *P. aeruginosa*. Nous avons également étudié l'activité protéolytique de cette enzyme sur les protéines membranaires externes de *P. aeruginosa* et sur OprF et enfin, nous avons fait appel à des techniques de protéomiques (l'électrophorèse 2D et la spectrométrie de masse) afin de déterminer la cible de la NE chez *P. aeruginosa*.

Neutrophil Elastase Mediates Innate Host Protection against *Pseudomonas aeruginosa*¹

Tim O. Hirche,^{2,3*} Rym Benabid,^{3*} Gaetan Deslee,* Sophie Gangloff,* Samuel Achilefu,[†] Moncef Guenounou,* François Lebagry,* Robert E. Hancock,[‡] and Azzaq Belaouaj^{4*}

According to the widely accepted view, neutrophil elastase (NE), a neutrophil-specific serine protease, is a major contributor to *Pseudomonas aeruginosa* infection-associated host tissue inflammation and damage, which in severe cases can lead to death. Herein, we provide for the first time compelling evidence that the host rather employs NE to protect itself against *P. aeruginosa* infection. Using a clinically relevant model of pneumonia, targeted deficiency in NE increased the susceptibility of mice to *P. aeruginosa*. We found that NE was required for maximal intracellular killing of *P. aeruginosa* by neutrophils. In investigating the mechanism of NE-mediated killing of *P. aeruginosa*, we found that NE degraded the major outer membrane protein F, a protein with important functions, including porin activity, maintenance of structural integrity, and sensing of host immune system activation. Consistent with this, the use of an isogenic mutant deficient in outer membrane protein F negated the role of NE in host defense against *P. aeruginosa* infection. *The Journal of Immunology*, 2008, 181: 4945–4954.

When the first lines of defense against invading microorganisms are breached, neutrophils rapidly accumulate at the site of infection. The primary purpose of this neutrophilic infiltration is the killing of pathogens and resolution of the associated inflammation (1). The importance of neutrophils in protection against microbes is demonstrated in patients with neutropenia or neutrophil dysfunctions who commonly experience recurrent and/or life-threatening infections (2–4). Various antimicrobial molecules have been identified in neutrophil granules and grouped into oxygen-dependent (5) and -independent systems (6). The latter system comprises the readily active serine proteinases, neutrophil elastase (NE),⁵ cathepsin G (CG), and proteinase 3, among other polypeptides known to alter the integrity of

bacteria. Like its family members, NE catalytic activity relies on the His⁵⁷-Asp¹⁰²-Ser¹⁹⁵ triad (chymotrypsin numbering system) where serine represents the active residue (7). Mature NE, a cationic glycoprotein, is stored in neutrophil primary granules at concentrations in the millimolar range, making it a major component of neutrophils (8). The human and mouse NE genes are highly related, and the codons of His-Asp-Ser catalytic triad residues are well conserved (9). In recent years, gene targeting of NE in mice revealed that the enzyme contributes considerably to host defense against microbial infections (10–15).

Pseudomonas aeruginosa is an obligately aerobic, rod-shaped bacterium that inhabits a variety of environmental niches, including soil, water, and opportunistically the human host. Due to its genetic flexibility and large genome, *P. aeruginosa* is biochemically versatile (16). Such features confer on this Gram-negative pathogen the ability to grow in many habitats and thrive in diverse circumstances. *P. aeruginosa* is virtually nonpathogenic in healthy people, but individuals with defective function of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator or impaired defense systems such as neutropenic or immunocompromised patients are commonly subjects to *Pseudomonas* infection (17, 18). *P. aeruginosa* is thus an opportunistic pathogen that causes both acute and chronic infections. The pathogen is notable for its high intrinsic resistance to antibiotics, and it is frequently isolated in various infectious settings involving the eye, skin, and respiratory tract. Regarding lung infections, *P. aeruginosa* is a leading pathogen causing nosocomial pneumonia, and among the most vulnerable hosts are the mechanically ventilated patients (19). Of note, mortality rates of patients with *P. aeruginosa* pneumonia have been shown to be higher than those of patients with pneumonia caused by other pathogens (20–22).

Following *P. aeruginosa* lung infection, neutrophils represent the earliest phagocytic cells that are attracted to the infected site (23). As a result of its capacity to target a variety of host cells and both soluble and insoluble substrates, NE has been always regarded as major contributor to *P. aeruginosa* infection-associated tissue inflammation and damage, which in severe cases can lead to death (24, 25). This view is supported by the long-held dogma that activated neutrophils excrete NE, which, because of the number of

*Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Programme Avenir, IFR53, University of Reims Champagne-Ardenne, Reims, France; [†]Department of Radiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO 63110; and [‡]Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia, Vancouver, Canada

Received for publication June 13, 2008. Accepted for publication July 25, 2008.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was supported by grants from Conseil Régional Champagne-Ardenne, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Programme Avenir (to R.B. and A.B.), Fondation pour la Recherche Médicale, and Agence Nationale de la Recherche (to A.B.), and Canadian Institutes of Health Research (to R.E.H., who holds a Canada Research Chair).

² Current address: Department of Pulmonary Medicine, University Hospital Frankfurt, Frankfurt 60590, Germany.

³ T.O.H. and R.B. contributed equally to this paper.

⁴ Address correspondence and reprint requests to Dr. Azzaq Belaouaj, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Hôpital Inflammation and Immunity of the Respiratory Epithelium Group, Centre Hospitalier Universitaire de Reims IFR53, 45, rue Cognacq Jay, Maison Blancher, Reims 51092, France. E-mail address: azzaq.belaouaj@univ-reims.fr

⁵ Abbreviations used in this paper: NE, neutrophil elastase; α 1-AT, α 1-antitrypsin; AEBSF, 4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride; BAL, bronchoalveolar lavage; CG, cathepsin G; CI, competitive killing index; IEF, isoelectric focusing; i.n., intranasal; MMP, metalloproteinase; MPO, myeloperoxidase; NPN, 1-N-phenylnaphthylamine; Om, outer membrane; OmPs, outer membrane proteins; OprF, outer membrane protein F; SEM, scanning electron microscopy; SLPI, secretory leukocyte protease inhibitor; TEM, transmission electron microscopy; WT, wild type.

Copyright © 2008 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/08/\$2.00

neutrophils present, overwhelms the lung's ability to neutralize it (26, 27). Consequently, while much interest has focused on the pathogenic effects of this enzyme, it remains unclear whether NE could actually combat *P. aeruginosa*.

Using genetically engineered mice deficient in NE, we demonstrate that the enzyme plays an important role in innate defense against *P. aeruginosa* infection. The importance of the protective role of NE was revealed in a clinically relevant model of *Pseudomonas pneumonia*. Our data indicate that neutrophils employ NE to kill *P. aeruginosa*. In investigating the mechanism of NE-mediated killing of *P. aeruginosa*, we identified the major outer membrane protein F (OprF) as a critical molecule degraded by NE. Significantly, the use of an isogenic mutant of *P. aeruginosa* deficient in OprF negated NE antibacterial role both in vitro and in the pneumonia model.

Materials and Methods

Mice, neutrophils, and bacteria

Animal handling and procedures were approved by the Animal Studies Committee at our institution. NE-deficient (NE^{-/-}) mice were generated by targeted mutagenesis (10). NE^{-/-} mice and their wild-type (WT) littermates had 129/SvEv or C57BL/6 genetic background and were sex and age (8–10 wk) matched.

Neutrophils were isolated from the mouse bone marrow or following i.p. injection of mice with glycogen as previously described (10, 28).

P. aeruginosa H103 and its isogenic mutant H636 (streptomycin resistant) deficient in the major OprF (OprF⁻) were used in this work (29). The mutant H636 was generated by insertion mutagenesis. Two clinical *P. aeruginosa* strains, *P.a.* 11881 and *P.a.* 12749, isolated from patients with pneumonia were obtained from the Bacteriology and Virology Division at Reims Hospital. *Escherichia coli* was from our laboratory collection of bacterial strains. Bacteria were washed twice with PBS (pH 7.4), and the OD of the cultures was determined at 600 nm ($1 \text{ OD}_{600 \text{ nm}} \cong 1 \times 10^9$ bacteria/ml) (15).

P. aeruginosa intranasal infection and survival of mice

Bacteria were passaged twice in mouse lungs before use (13). Mice were anesthetized and intranasally (i.n.) challenged with bacteria (23). At least 30 WT mice were i.n. injected with varying amounts of *P. aeruginosa* H103 bacteria, and their survival was followed over time. From these experiments, the concentration of *P. aeruginosa* H103 that killed ~50% of WT mice was determined by interpolation (LD₅₀, ~9 × 10⁶ CFUs/mouse in 50 μl PBS). Next, NE^{-/-} and WT mice (*n* = 12/genotype) were i.n. infected with the LD₅₀ and their survival was monitored during 72 h.

In subsequent experiments, groups of NE^{-/-} and WT mice (*n* = 12/genotype) were i.n. infected with *P. aeruginosa* H103 or its isogenic mutant OprF⁻, and their survival was followed during 72 h. Bacteria were used at a dose of ~9 × 10⁶ CFUs and 5-fold higher (~5 × 10⁷ CFUs).

Fluorescence imaging

To ensure that mouse lungs were infected, NE^{-/-} and WT mice were challenged with fluorescent-labeled *P. aeruginosa* H103 and examined using fluorescence imaging (30). Specifically, bacteria were labeled with the near-infrared fluorophore bispropylcarboxymethylindocyanine (cypate). Cypate was synthesized as described previously and dissolved in DMSO (10 mg/ml). Twenty microliters of this solution was added to bacteria (1 × 10⁹) in a total volume of 1 ml PBS at room temperature. Following 30 min incubation on a nutator, bacteria were extensively washed to remove unbound fluorophore and resuspended in 1 ml PBS. Of note, cypate and DMSO treatments affected neither the viability nor the growth of bacteria as determined by the plating method (data not shown). Next, groups of mice were challenged i.n. with 50 μl of labeled bacteria (3.5 × 10⁷ CFUs/mouse) (four per genotype) or saline alone (two per genotype). Four hours later, all mice were sacrificed as above and their lungs, liver, spleen, and stomach excised (23). Imaging of fluorescence ($\lambda_{\text{max,abs}}$ 786 nm; $\lambda_{\text{max,em}}$ 811 nm) in each organ was performed using a Photometrix CoolSNAP HQ scanner and WinView software (Princeton Instruments). The near-infrared light permits the study of the distribution of the fluorophore in deep tissues since absorption and scattering of emitted light by endogenous biomolecules are minimal. Also, the fluorophore penetrates tissue barriers without the accompanying autofluorescence that occurs in the UV/visible spectrum.

Lung histology and immunostaining

NE^{-/-} and WT mice were subjected to i.n. instillation of *P. aeruginosa* (LD₅₀) or sterile HBSS (pH 7.4) (*n* = 4 mice/genotype and condition) and sacrificed 16 h postchallenge (23). Next, mice were processed for lung histology and immunohistochemistry using mouse myeloperoxidase Ab (MPO, dilution, 1/3000) (31).

Differential cell counts and bacterial viability

Experiments were performed as previously described (13, 23). Blood samples were collected from the inferior vena cava. Next, mouse lungs were perfused and lavaged in situ with HBSS (pH 7.4) and aseptically removed. Both blood and bronchoalveolar lavages (BALs) were normalized to the returned volumes. Total and differential counts and viability of inflammatory cells in lavage fluids were immediately determined. Equal aliquots of blood, BAL fluids, or homogenized lungs were serially diluted and plated to determine the number of viable bacteria.

Bactericidal activity of neutrophils and purified NE

Neutrophil antibacterial activity was assessed as previously described, with the following modification (10). Briefly, the number of WT neutrophils that killed ~50% of *P. aeruginosa* (10⁷ bacteria) was first predetermined (10⁶ cells). Next, bacteria were prepared as described above, resuspended in DMEM supplemented with 10% mouse serum, and added onto the monolayer of NE^{-/-} or WT neutrophils at a ratio of 1:10 (cell/bacterium). Neutrophil-mediated killing was assessed as the decrease in the number of viable bacteria relative to the total number of input bacteria. Experiments were performed four times.

NE bactericidal assay was conducted as previously described, with the following modifications (13). Bacteria were exposed to varying NE doses and their viability was determined. From these experiments, the dose of NE that killed ~50% of bacteria (10⁷ bacteria) was determined (2 μg). Next, freshly grown *P. aeruginosa* (1 × 10⁷ bacteria) were incubated alone or with NE alone or preincubated with the specific serine proteinase inhibitors AEBSF (4-(2-aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride hydrochloride) (1 mM) or α1-AT (α1-antitrypsin) (5 μg) (Sigma-Aldrich). Neither AEBSF nor α1-AT affected bacterial growth at the indicated concentrations (data not shown). Following incubation for 60 min, the numbers of CFUs were determined by plating method. In parallel experiments, NE activity in the reaction was examined using its specific chromogenic substrate, Meo-Suc-Al-Al-Pro-Val-pNA (Sigma-Aldrich), in the absence or presence of the above inhibitors (31).

Unless otherwise stated, this NE dose was used in all subsequent experiments. Of note, the purity and activity of NE (Elastin Products) were confirmed by SDS-PAGE and zymography and/or spectrophotometrically using NE-specific chromogenic substrate.

Fluorescence microscopy

The viability of bacteria following exposure to NE was further assessed by fluorescence microscopy using two-color visualization of dead and live cells (13).

Transmission and scanning electron microscopy

After incubation with or without NE, bacteria were processed for scanning electron microscopy (SEM) or transmission electron microscopy (TEM) as previously described (10, 13).

Isolation and incubation with NE of *P. aeruginosa* outer membrane proteins (Omps)

An overnight culture of *P. aeruginosa* (H103 and clinical strains) diluted 1/100 was grown in Luria-Bertani medium (500 ml) aerobically under gentle shaking conditions at 37°C to late exponential phase. Cultures were centrifuged (6000 × *g*, 15 min) and pellets washed with Tris-HCl (50 mM (pH 7.3)). Next, bacteria fractionation was performed (32). Briefly, bacterial pellets were resuspended in 5 ml of Tris-HCl (50 mM (pH 7.3)) and lysed by sonication. Following endonuclease treatment, the mixture was centrifuged (8000 × *g*, 10 min). The supernatant was diluted up to 60 ml in ice-cold sodium carbonate (0.1 M (pH 11)), stirred for 1 h at 4°C, and subjected to ultracentrifugation (100,000 × *g*, 1 h at 4°C). Next, the pellet was resuspended in 5 ml of Tris-HCl (50 mM, pH 7.3) for one more additional wash. The pellet, which contains Omps fraction, was collected by ultracentrifugation and resuspended in 2 ml of Tris solution.

Omps and purified flagellin protein were incubated without or with NE and migrated on protein gels. Next, the reactions were Coomassie blue stained or processed for Western blotting using an Ab specific for the OprF (dilution 1/20,000) (13, 15, 33).

Two-dimensional electrophoresis, gel image analysis, and mass spectrometry

Five hundred micrograms of Omps was incubated without or with NE (10 μ g) for 1 h at 37°C (300 μ l reaction volume) as described above. An aliquot of the reaction (5 μ l) was resolved by SDS-PAGE and Coomassie blue stained to ensure a similar degradation profile as above. Next, the reactions were lyophilized and resuspended in 300 μ l of a solution suitable for isoelectric focusing (IEF, first dimension) (7 M urea, 2 M thiourea, 1% (w/v) tetradecanoylamido-propyl-dimethyl amido-sulfobetaine-14 (ASB-14), 40 mM Tris, 2 mM tributyl phosphine (TBP), and 0.5% (v/v) Biolytes 3-10). Following the manufacturer's protocol, 17-cm IPG strips (pH 3–10) were rehydrated with IEF solution containing untreated or NE-treated Omps under active mode using the Protean IEF Cell (Bio-Rad) at 50 V for 12–16 h. Next, IEF was conducted using the above apparatus for 40,000 V-hours at a maximum of 10,000 V. Before the second dimension, IPG strips were equilibrated for 10 min in 6 M urea, 0.38 M Tris (pH 8.8), 2% SDS, 20% glycerol, and 2% (w/v) DTT, and then in the same solution in which DTT was replaced with iodoacetamide for an additional 10 min. Next, the IPG strips were embedded onto a 12.5% SDS-PAGE gel (two-dimension) with 1% (w/v) low melting agarose in SDS-PAGE buffer. Gels were run at 25 V for 2 h at 4°C, then 85 V overnight. The reactions were performed in duplicate. One set of gels was processed for immunoblotting as described above using anti-OprF Ab. The other set of gels was stained using a fluorescent dye-based stain, SYPRO Ruby (Bio-Rad), according to the manufacturer's recommendations. Stained gels were scanned using Fluor-S MAX MultiImager System (Bio-Rad) and their images processed for comparative analysis using PDQuest software (Bio-Rad). Protein spots that were similar in control (untreated Omps) and sample (NE-treated Omps) gels were used as landmarks for matching and to facilitate better comparison of gels. Experiments were performed in triplicate to ensure the reproducibility of the protein pattern. The protein spot detected by immunoblotting with anti-OprF Ab was localized on the stained gel, cut, and in-gel digested with trypsin and the peptides were recovered as described elsewhere (32, 34). The peptide mass fingerprints of tryptic peptides were generated by MALDI-TOF mass spectroscopy and subsequently compared with database containing virtual fingerprints obtained by theoretical tryptic cleavage of *Pseudomonas* proteins (<http://www.pseudomonas.com>). The identity of the selected protein spot from the major band was further confirmed by amino acid sequencing.

Amino acid sequencing

N-terminal sequences of OprF or its degradation products were identified by automated Edman degradation with an Applied Biosystems sequenator (35).

Purification and exposure to proteases of OprF

OprF was purified from the crude *P. aeruginosa* outer membrane (Om) fractions by reversed-phase HPLC (System Gold analyzer, Beckman Coulter) using a previously described method (36). Purified OprF was incubated alone or in the presence of the indicated concentrations of active NE, CG, lysozyme, or metalloproteinase-7 (MMP-7) for varying times (13). The reactions were resolved by SDS-PAGE and Coomassie blue stained or subjected to Western blotting using anti-OprF Ab. Of note, human neutrophil CG (Elastin Products) and lysozyme (Sigma-Aldrich) and recombinant active human matrix MMP-7 (kindly provided by Dr. W. Parks, University of Washington, Seattle, WA) were tested for their purity and activity by SDS-PAGE and zymography and/or spectrophotometrically using specific substrates according to the manufacturer's recommendations.

Exposure of intact bacteria to NE and Omps to neutrophils

Bacteria were cultured in the absence or presence of NE for varying times and the reactions were processed for Western blotting using anti-OprF Ab (10).

Aliquots of WT or NE^{-/-} neutrophils (2 \times 10⁶ cells in 200 μ l HBSS (pH 7.4)) were primed and stimulated as previously described (35). Next, Omps (5 μ g) were added to the reactions, which were incubated overnight at 37°C (pH 7.4). In some experiments, neutrophils were preincubated with the serine proteinase inhibitors AEBSF (1 mM) or secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) (10 μ g) (R&D Systems) for 15 min at 37°C before addition of Omps. Controls included Omps incubated alone or with purified NE (2 μ g) and neutrophils alone. Following incubation, samples were acetone-concentrated and subjected to SDS-PAGE and Western blotting (35). Under these experimental conditions, 60% of the cells were dead following overnight incubation, as judged by trypan blue dye exclusion. Levels of released active NE from WT neutrophils were determined by

comparison to purified NE using colorimetric enzymatic assay as described above (data not shown).

Competition assay

Comparison of the susceptibility of WT *P. aeruginosa* and its isogenic mutant OprF⁻ to NE attack was conducted using the competition assay. In vitro competition studies were performed following modifications of a previously described method (37). First, WT *P. aeruginosa* and its isogenic mutant OprF⁻ were freshly grown to mid-log phase and adjusted to the same OD. Then, an OD value of WT *P. aeruginosa* that resulted in ~50% bacterial killing in the presence of NE (2 μ g) was predetermined. Subsequently, bacterial suspensions comprising a 50:50 mixture of WT and mutant bacteria were cultured in the absence or presence of NE as described above. Next, serial dilutions of the reactions were plated onto Luria-Bertani agar plates without or with streptomycin to determine the numbers of CFUs for WT and OprF⁻ strains. The competitive killing index (CI) is calculated by dividing the ratio of mutant CFUs/WT CFUs obtained in the presence of NE by the ratio of mutant CFUs/WT CFUs obtained in the absence of NE. If the CI is <1, this indicates that the susceptibility of isogenic mutant OprF⁻ to NE was at least similar to that of WT *P. aeruginosa*. If the CI is >1, this indicates that isogenic mutant OprF⁻ was more resistant than WT *P. aeruginosa* to NE.

1-N-phenyl-naphthylamine (NPN) assay

NPN is a fluorescent probe commonly used to study membrane integrity (38, 39). NPN fluoresces weakly in aqueous solution, but becomes strongly fluorescent when taken up by altered membranes (hydrophobic environment). Bacteria were cultured with or without addition of NE as described above. Following 30 min incubation, NPN was added and the fluorescence intensity was measured 5 min later ($\lambda_{\text{max,abs}}$ 350 nm; $\lambda_{\text{max,em}}$ 420 nm) using the SpectraMax Gemini spectrofluorometer (Molecular Devices). Control experiments without or with NE alone were included. Fluorescence corresponding to cell-bound NPN was corrected by subtracting the values obtained in control experiments. The fold increase of NPN uptake was expressed as the ratio of fluorescence values recorded in NE-treated bacteria over untreated bacteria.

Statistical analysis

Kaplan-Meier survival curves were analyzed by the log-rank test. Data of other experiments are expressed as the means \pm SEM. Where appropriate, statistical differences between groups were tested using Student's unpaired *t* test. For samples that were not normally distributed, the Mann-Whitney *U* test was applied. Statistical significance was assumed at a predefined level of *p* < 0.05.

Results

NE deficiency increases mouse mortality in *P. aeruginosa* i.n. infection model

To determine the role of NE in combating *P. aeruginosa* infection, groups of NE^{-/-} and WT control mice were exposed via i.n. instillation to 9 \times 10⁶ CFUs of *P. aeruginosa* H103 (representing the LD₅₀ for WT mice) and their survival was monitored during 72 h. Initially, NE^{-/-} mice exhibited signs of severe infection (ruffled fur, lethargy, diarrhea) that were markedly less striking than in control mice. At 24 h postchallenge, 50% of NE^{-/-} mice but none of the WT mice succumbed to infection. By 56 h, >80% of NE^{-/-} mice died, whereas, as expected, only 50% of WT mice died (Fig. 1A). None of the survivors died subsequently. Of note, the NE immune role was bacterial dose dependent. For example, a 2.5-fold lesser dose of bacteria than LD₅₀ resulted in pronounced sign of distress in NE^{-/-} mice a few hours postinfection, but no death was recorded in both WT and NE^{-/-} mice (Refs. 15, 23 and data not shown). However, 100% of NE^{-/-} mice vs 83% of WT mice died when challenged with a 3-fold higher dose than the LD₅₀ (data not shown). In separate experiments, groups of NE^{-/-} and WT control mice were i.n. challenged with near-infrared fluorescent-labeled *P. aeruginosa* H103. Fluorescence imaging analysis demonstrated that the main site of infection was the lung, suggesting that i.n. instillation of bacteria is a reliable and reproducible lung infection

4948

NE PROTECTS THE HOST AGAINST *P. aeruginosa*

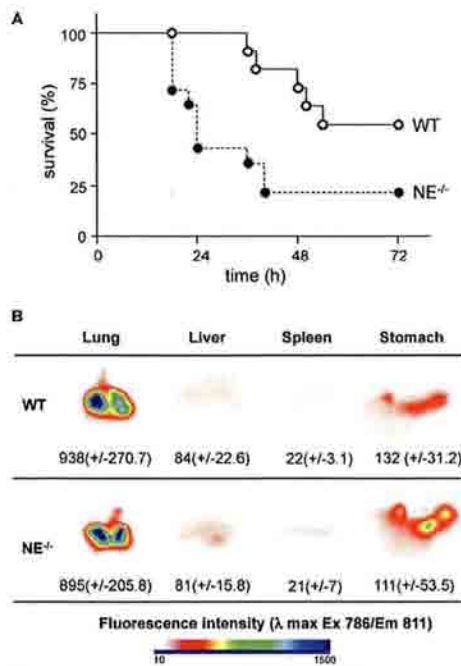


FIGURE 1. Intranasal infection of NE^{-/-} and WT mice. **A**, Kaplan-Meier survival curves of NE^{-/-} and WT C57BL/6 mice following i.n. challenge with *P. aeruginosa* (9×10^6 CFUs/mouse, which represents the LD₅₀ for WT mice). Increased mortality of NE^{-/-} mice was statistically significant ($p = 0.0169$). Similar data were obtained using mice with 129/SvEv genetic background (data not shown). **B**, Spreading of *P. aeruginosa* monitored by fluorescence imaging. Shown are representative images of the lungs and other organs 4 h following i.n. challenge of NE^{-/-} and WT mice with cypate-labeled *P. aeruginosa*. Quantified data of fluorescence intensity are indicated in which each datum represents the mean \pm SEM of four mice. No fluorescence staining was detected in the organs of mice challenged with saline (data not shown). Note that most bacteria were localized in the lungs ($p > 0.05$ for differences between genotypes).

model and that *P. aeruginosa* did not disseminate (Fig. 1B). Importantly, survival data demonstrate that NE contributes substantially to host protection from morbidity and mortality associated with *Pseudomonas* lung infection.

NE mediates P. aeruginosa killing by neutrophils

To explore the underlying basis for the vulnerability of NE^{-/-} mice to *P. aeruginosa* infection, we examined the capacity of NE^{-/-} and WT mice to clear bacteria from the lungs. First, lung tissues and BAL fluids obtained from saline-instilled WT and NE^{-/-} mice appeared to have normal histology and resident macrophages (Fig. 2, A and B). Analyses of lung tissue sections from *P. aeruginosa*-challenged NE^{-/-} and WT mice revealed similar patchiness of cellular infiltrates (Fig. 2, C and E). In accordance with our previously published results (10, 23, 31), total cell and differential counts of BAL fluids from both types of mice showed comparable leukocyte numbers and confirmed neutrophils as the dominant cells (data not shown; Fig. 2, D and F). Immunostaining for MPO confirmed that these infiltrates are indeed predominated by neutrophils (Fig. 2G). As judged by cytospin analyses, there were no significant differences in the numbers of other immune cells including macrophages and lymphocytes. Furthermore, the absence of NE did not impair the ability of neutrophils to interact

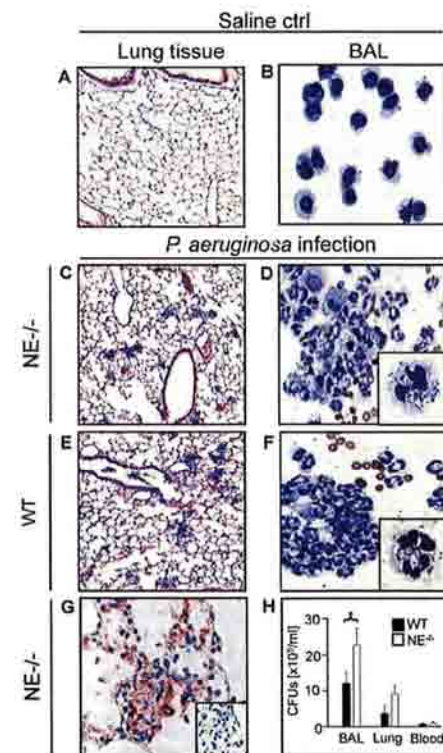


FIGURE 2. Mouse lung histology and bacterial clearance. **A** and **B**, Representative H&E-stained lung tissues and micrograph of Wright's-stained cytospins from NE^{-/-} mice 16 h after i.n. instillation of sterile saline (magnification, $\times 40$ and $\times 400$ respectively). Similar histology was observed in WT lung tissues. **C**, **D** and **E**, **F**, Representative H&E-stained lung tissues and micrograph of Wright's-stained cytospins from NE^{-/-} and WT mice 16 h after i.n. infection with *P. aeruginosa* (magnification, $\times 40$ and $\times 400$, respectively). *Inset*, Representative neutrophil surrounding and/or engulfing bacteria (magnification, $\times 1000$). Of note, the patterns of patchy cellular infiltrates were similar in NE^{-/-} and WT mice and morphologic analysis found the predominance of neutrophils as confirmed by immunostaining for MPO in **G**. **G**, Representative immunostaining of *P. aeruginosa*-infected NE^{-/-} lung tissues using anti-MPO Ab, a specific marker for neutrophils (red color, alkaline phosphatase staining) (magnification, $\times 200$). No immunostaining was observed in infected lungs using rabbit preimmune serum (*inset*). Note that a similar immunostaining pattern was observed in WT lung tissues. **H**, Representative data of bacterial clearance from BAL fluids, lavaged lungs, and blood of NE^{-/-} and WT mice 16 h postinfection. As controls, no bacterial growth was detected in lungs of NE^{-/-} mice that were i.n. instilled with sterile saline. Note that while CFU counts of lavaged lungs were different between genotypes, they did not reach statistical significance. Data are presented as mean CFU counts \pm SEM; differences between genotypes were analyzed by the Mann-Whitney *U* test (*, $p = 0.0278$ for BALs).

with bacteria (Fig. 2, D and F, *inset*). However, the number of bacteria in NE^{-/-} lung tissues (BALs and lavaged lungs) was much greater than that seen in WT lung tissues (Fig. 2H). Indeed, the inability of NE^{-/-} mice to clear *Pseudomonas* as efficiently as WT mice was clearly observable early in infection and persisted for up to 72 h (data not shown). Of note, the bacterial burden was similar but insignificant in the bloodstream as well as in spleen, liver, and kidneys of both groups of mice, further confirming the

absence of *P. aeruginosa* dissemination (Fig. 2H and data not shown).

Next, we compared the ability of NE^{-/-} and WT neutrophils to kill *P. aeruginosa* in vitro. To assess their bactericidal activity, NE^{-/-} and WT bone marrow neutrophils were exposed to bacteria. After a 60-min incubation, NE^{-/-} neutrophils were less able to kill bacteria when compared with WT neutrophils (<10% and >40% reduction in bacteria from $3.3 \pm 0.41 \times 10^5$ CFUs in controls to $3 \pm 0.49 \times 10^5$ in NE^{-/-} neutrophils and to $2.03 \pm 0.2 \times 10^5$ in WT neutrophils). Of note, we confirmed that the respiratory burst and extent of phagocytosis were not impaired in NE^{-/-} neutrophils (data not shown). Taken together, these results strongly suggest an important role for NE in neutrophil-mediated clearance of *P. aeruginosa*.

Direct killing of *P. aeruginosa* by NE

We incubated purified NE directly with *P. aeruginosa* H103 to assess the enzyme's antibacterial activity against this pathogen. Addition of NE markedly decreased *P. aeruginosa* growth (Fig. 3A). Preincubation of NE with both synthetic and physiologic inhibitor resulted in normal bacterial growth, indicating that NE employs its catalytic activity for bactericidal function. In other experiments, NE-mediated decrease of *P. aeruginosa* growth was investigated as a function of various parameters, including those of the phagolysosomal environment (e.g., ionic strength and pH). Overall, NE killing of *P. aeruginosa* was dependent on the ratio of enzyme concentration to inoculum size, the pH of the reaction, and incubation time, but was independent of the growth phase and salt concentration under our experimental conditions (data not shown). Interestingly, using similar experimental conditions as with *P. aeruginosa* H103, the growth of two clinical strains isolated from patients with pneumonia was also markedly decreased in the presence of NE (Fig. 3B).

To investigate the impact of NE on *P. aeruginosa*, a series of experiments were conducted under conditions where NE killed ~50% of bacteria. The killing ability of NE was examined by fluorescence staining to distinguish live from dead bacteria. The results demonstrated that in the presence of NE, DNA of dead bacteria with damaged membranes fluoresced bright green, whereas DNA of live bacteria with intact membranes stained red (Fig. 3C). Next, NE-mediated damage to *P. aeruginosa* was assessed by examining the bacterial membrane permeability (Fig. 3D). Using NPN assay, we observed that incubation of *P. aeruginosa* with NE was followed by an increased fluorescence intensity of the reaction, reflecting increased NPN binding to altered membranes. Both SEM and TEM further confirmed these observations. SEM revealed that NE-exposed *P. aeruginosa* lost their typical rod-shaped morphology with the appearance of nodules and collapsed architecture (Fig. 3E). TEM demonstrated that in the presence of NE, the inner and outer membranes of *P. aeruginosa* were no longer discernable, resulting in a distorted structural integrity (Fig. 3F).

NE degrades *P. aeruginosa* major OprF

We hypothesized that proteins from *P. aeruginosa* Om would be susceptible to degradation by NE, resulting in bacterial death. To determine the bacterial target(s) of NE, we grew *P. aeruginosa* and subjected it to fractionation to selectively extract Omps. Unlike *E. coli*, which comprises two major Om bands, Om fractions of *P. aeruginosa* H103 and clinical strains have a single predominant band (Fig. 4A and data not shown). Remarkably, this major Om band was completely degraded by NE (Fig. 4A). Western blot analysis found that the polyclonal Ab raised against major OprF immunoreacted specifically with this band and did not crossreact with other *P. aeruginosa* cell surface proteins (e.g., flagellin) (Fig. 4B).

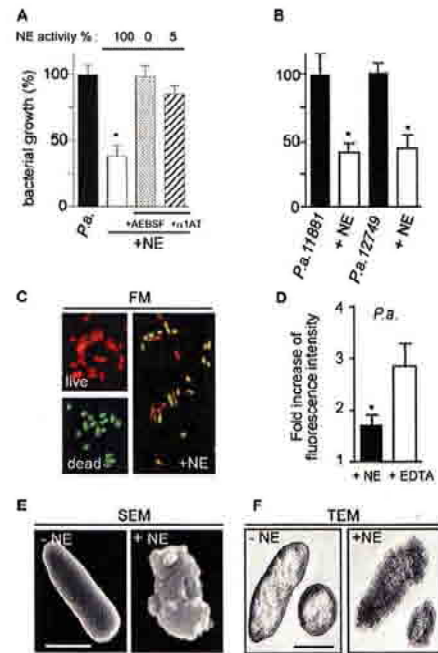


FIGURE 3. NE effect on bacteria. A and B, NE kills *P. aeruginosa* using its catalytic activity. A, *P. aeruginosa* H103 (1×10^7) was incubated alone or with NE ($2 \mu\text{g}$). In duplicate experiments, NE was preincubated with its chemical (AEBSF, 1 mM) or physiologic ($\alpha 1$ -AT, 5 μg) inhibitors for 5 min before addition of bacteria. Bacterial viability was expressed as percentage of bacterial growth. Aliquots of the reactions were tested for NE activity using the colorimetric assay as previously described (23) (top). AEBSF and $\alpha 1$ -AT inhibited NE activity (>96%) but did not affect *P. aeruginosa* growth. B, As with *P. aeruginosa* H103, NE had comparable antibacterial effect on *P. aeruginosa* clinical isolates. Means \pm SEM of four independent experiments are shown, and data were analyzed by Student's unpaired *t* test (*, $p < 0.05$ for differences between NE-treated vs untreated conditions). C, Fluorescence microscopy of *P. aeruginosa*. Bacteria were incubated without (live) or with NE (+NE) as described above. As control for death (dead), bacteria were heat-killed. Next, the reactions were stained with a mixture of SYTO59 and SYTOX, and viewed using two separate bandpass optical filters. Captured images were merged. DNA of live (intact cell membranes) and dead (disrupted membranes) bacteria fluoresce red with SYTO59 and bright green with SYTOX, respectively (magnification, $\times 2000$). D, Following incubation of *P. aeruginosa* H103 with or without NE, NPN was added and the fluorescence, indicator of bacterial membrane permeability, was measured. Shown are data for the fold increase in fluorescence intensity in NE-treated *P. aeruginosa* H103 as defined in *Materials and Methods*. EDTA (50 mM final) was used as control for perturbed membrane integrity. Means \pm SEM of three independent experiments are shown, and data were analyzed by the unpaired *t* test (*, $p < 0.05$ for differences between NE-treated vs untreated conditions). E and F, Electron micrographs of *P. aeruginosa* incubated without (-NE) or with NE (+NE). Bacteria were incubated without or with NE as described above and the reactions were processed for SEM or TEM. E, Shown are electron micrographs of single cells (magnification, $\times 40,000$; scale bar, 1 μm). F, Shown are electron micrographs of longitudinal and transverse cross-sections of single cells (magnification, $\times 40,000$; scale bar, 1 μm). Micrographs are illustrative of four independent experiments.

To ensure the identity of the major Om band, *P. aeruginosa* Om fraction was incubated alone or with NE and the reactions were processed for two-dimensional gel electrophoresis as described in *Materials and Methods*. As shown in Fig. 4C, *P. aeruginosa* Om

4950

NE PROTECTS THE HOST AGAINST *P. aeruginosa*

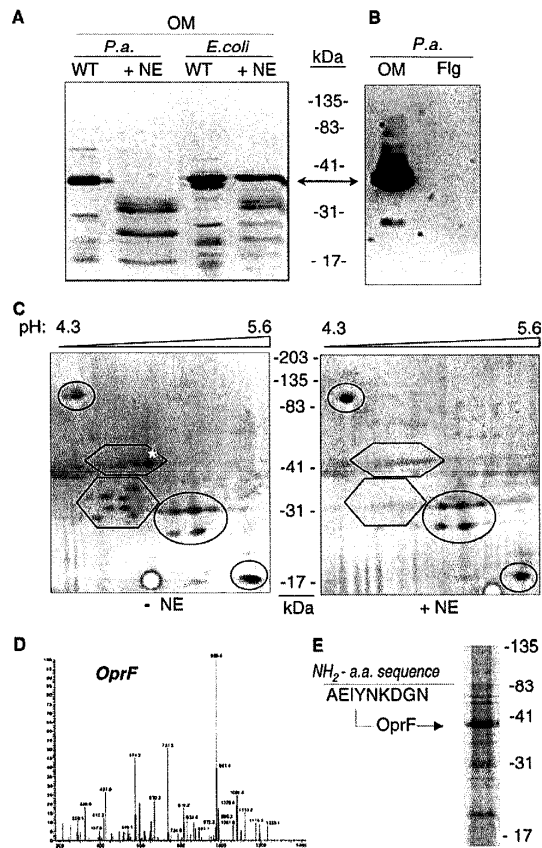


FIGURE 4. Exposure of *P. aeruginosa* Om protein fraction to NE. *P. aeruginosa* or *E. coli* were grown and subjected to fractionation. **A**, Both *P. aeruginosa* H103 and *E. coli* Om fractions (5 μ g) were incubated with or without NE (2 μ g) and the reactions were resolved by SDS-PAGE under reducing conditions and visualized by Coomassie blue staining. Unlike *E. coli*, which contains two major Omproteins (*), *P. aeruginosa* contains one predominant Om protein (\blacklozenge), which is completely degraded following incubation with NE. **B**, Aliquots of *P. aeruginosa* Om fraction and flagellin proteins were resolved by SDS-PAGE and processed for Western blotting using a specific Ab against major outer membrane protein OprF. **C**, *P. aeruginosa* Om fraction (500 μ g) was incubated alone or in the presence of NE (10 μ g) and the reactions were separated using two-dimensional PAGE (2-D). The reactions were performed in duplicate. One set of reactions (**C**) was SYPRO-stained. The other set was processed for immunoblotting using anti-OprF Ab (data not shown). Shown are representative two-dimensional gel images. Ovals depict proteins that are resistant to NE proteolytic activity, whereas hexagons depict proteins that are degraded by NE. Data are illustrative of at least three independent experiments per condition. **D**, The protein spot (asterisk in **C**), which immunoreacted specifically with anti-OprF Ab (data not shown) was processed for mass spectrometry and identification in the database as described in methods. **E**, N-terminal amino acid sequence of OprF. Arrowhead points to sequenced band.

fraction is complex, and despite NE potent activity, the enzyme degraded some (hexagons) but not all Omproteins (ovals). Immunoblotting of two-dimensional transfer membranes using OprF Ab detected specifically one protein spot (data not shown). Overlapping of Western and stained-gel images allowed the localization of this protein spot (Fig. 4C, asterisk). Mass spectrometry analysis and

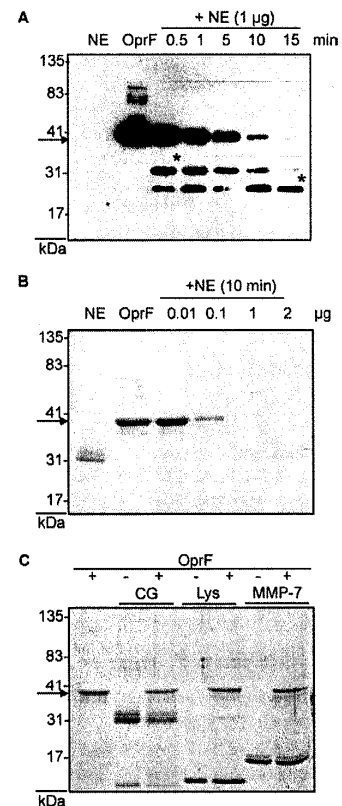


FIGURE 5. Analysis of proteolytic degradation of purified OprF. **A**, Purified OprF (1 μ g) from *P. aeruginosa* Om protein fraction was incubated alone or with NE for the indicated times and the reactions were processed for immunoblotting using anti-OprF-specific Ab. Note that degradation of OprF by NE began with the appearance of intermediate fragments (up to 15 min) and is complete by 30 min (data not shown). OprF Ab did not cross-react with NE. **B**, OprF was incubated with increasing concentrations of NE for 10 min and the protein integrity was assessed by Coomassie blue staining. Note that complete degradation of OprF is NE concentration-dependent. **C**, Purified OprF protein was incubated with 2 μ g of active CG, lysozyme (Lys), or MMP-7 for 60 min and the reactions were processed for Coomassie blue staining. None of these enzymes degraded OprF like NE. Arrow indicates the position of intact OprF. Experiments were repeated three times with similar results.

database searching identified the spot as the major Om protein (OprF) (Fig. 4D). This finding was further confirmed by N-terminal amino acid sequencing (Fig. 4E).

Degradation of OprF is NE-specific and dependent on incubation time and enzyme concentration

To characterize its cleavage by NE, OprF was purified from *P. aeruginosa* Om fraction. Incubation of the protein with NE for the indicated times resulted in stepwise degradation of OprF with the generation of distinct intermediate fragments (Fig. 5A, asterisk). To localize NE cleavage sites, the two major degradation products were identified by Coomassie blue staining and subjected to NH₂-terminal amino acid sequencing. Analysis of these results indicated a similar amino acid sequence for both fragments corresponding to OprF N-terminal sequence indicating a C-terminal processing of OprF by NE (data not shown). Next, NE-mediated degradation

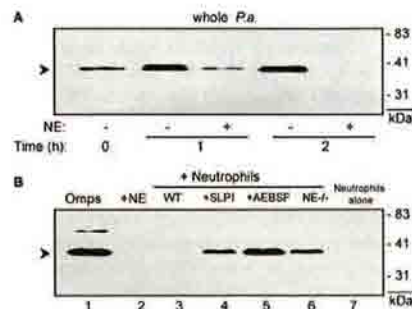


FIGURE 6. Characterization of OprF degradation by NE. *A*, Mid-log grown bacteria (1×10^7) were incubated with or without NE ($2 \mu\text{g}$) for varying times and the reactions processed for Western blotting using anti-OprF-specific Ab. Arrowhead indicates the expected position of OprF. *B*, *P. aeruginosa* Om proteins (Omps, $5 \mu\text{g}$) were incubated with purified NE ($2 \mu\text{g}$) or isolated murine neutrophils (2×10^6 cells) alone or preincubated with NE physiologic (SLPI, $2.5 \mu\text{g}$) or chemical (AEBSF, 1 mM) inhibitors overnight, and the reactions were processed for immunoblotting using anti-OprF-specific Ab. Note that anti-OprF Ab did not crossreact with neutrophil proteins (lane 7). Arrowhead indicates the expected position of OprF. The findings are illustrative of three independent experiments.

was monitored as a function of enzyme concentration. Fig. 5B shows that treatment of OprF with increasing concentration of NE led to progressive degradation of the protein. Conversely, preincubation of NE with the serine proteinase inhibitors AEBSF or $\alpha 1$ -AT prevented OprF degradation (data not shown). To assess the relative importance of NE-mediated degradation of OprF, other enzymes known to be involved in host antibacterial defense mechanisms were examined. Using experimental conditions comparable to those of NE, the proteases cathepsin G and lysozyme did not degrade OprF and MMP-7 cleaved this protein very poorly (Fig. 5C).

Neutrophil-derived NE degrades OprF in intact P. aeruginosa

To determine whether NE degrades OprF in intact *P. aeruginosa*, we incubated viable bacteria with NE. Our immunoblotting results using anti-OprF-specific Ab showed that in the absence of NE, OprF remained intact and that its expression increased considerably over time (0 vs 1 h) (Fig. 6A). However, incubation of bacteria with NE was accompanied by substantial degradation of OprF as early as 1 h (Fig. 6A), coinciding with loss of bacterial structure and morphology and death (Fig. 3, A and C–F, and data not shown). These results indicate that NE is capable of targeting OprF localized in the Om of intact *P. aeruginosa* bacteria.

Next, we sought to determine whether neutrophils (containing NE) generate similar cleavage of OprF as did purified NE. Using chromogenic substrate-based enzymatic assay, the number of activated neutrophils added per reaction was estimated to yield a concentration of NE comparable to that used in Fig. 4A. Incubation with activated WT neutrophils resulted in complete degradation of OprF similar to that obtained with purified NE (Fig. 6B, lanes 2 and 3). Significant inhibition of OprF degradation was observed when incubation was conducted in the presence of AEBSF, a relatively stable broad-spectrum serine protease inhibitor (Fig. 6B, lane 5). Incubations in the presence of EDTA gave no appreciable inhibition, suggesting the inability of neutrophil-derived metalloproteinases to cleave OprF (data not shown). To assess the specific

Table 1. Effect of NE on the viability of *P. aeruginosa* H103 (WT) and its isogenic mutant deficient in OprF (OprF⁻)

Bacteria	Number of CFUs	
	-NE	+NE
Mix of WT <i>P. aeruginosa</i> and OprF ⁻	90.8 ± 2.3	60.3 ± 3.9
Mix of WT <i>P. aeruginosa</i> and OprF ⁻ (+ streptomycin)	43.0 ± 5.2	36.7 ± 2.5
WT <i>P. aeruginosa</i> (deduced)	47.8 ± 4.5	23.6 ± 4.1
Ratio of OprF ⁻ CFUs/WT CFUs	0.89	1.55
CI	1.74 ^a	

^a CI is calculated by dividing the ratio of OprF⁻ CFUs and WT CFUs obtained in the presence of NE (+NE) over the ratio of OprF⁻ CFUs and WT CFUs obtained in the absence of NE (-NE).

role of NE in mediating OprF degradation by neutrophils, we incubated OprF with neutrophils isolated from mice deficient in NE. Equivalent numbers of NE-deficient neutrophils showed less degradation of OprF as compared with WT neutrophils (Fig. 6B, lanes 3 and 6). Of note, overnight incubation of Omps alone did not cause a spontaneous degradation of OprF (Fig. 6B, lane 1). Thus, these findings demonstrate that NE contributes to the efficient degradation of OprF by neutrophils.

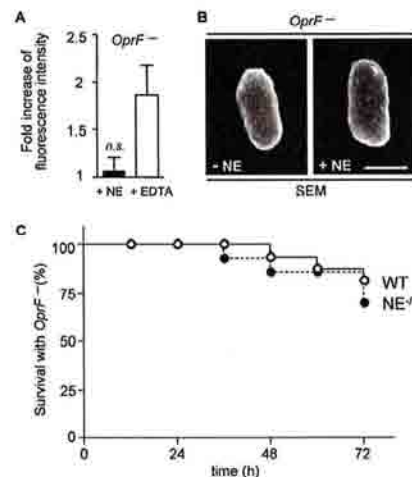


FIGURE 7. Roles of OprF in maintenance of bacterial integrity and mouse susceptibility to *P. aeruginosa* lung infection. *A*, Following incubation of mutant (OprF⁻) bacteria with or without NE, NPN was added and the fluorescence was measured. Shown are data of fold increase in fluorescence intensity in NE-treated OprF⁻ reaction. EDTA (50 mM final) was used as control for perturbed membrane integrity. Means ± SEM of three independent experiments are shown, and data were analyzed by Student's unpaired *t* test ($^* p < 0.05$ for differences between NE-treated vs untreated conditions). *B*, Electron micrographs of OprF-deficient *P. aeruginosa* incubated without (-NE) or with NE (+NE). Bacteria were incubated without or with NE and their viability and morphology were examined as described in *Materials and Methods*. In the absence of OprF, mutant strains showed no statistically significant decrease in their growth (Table 1, data not shown) and no altered morphology in the presence of NE (magnification, $\times 40,000$; scale bar, $1 \mu\text{m}$). Micrographs are illustrative of four independent experiments. *C*, Kaplan-Meier survival curves for NE^{-/-} and WT mice in response to intranasal challenge with OprF⁻ (5×10^7 CFUs/mouse). Note that survival rates were not significantly different between WT and NE^{-/-} mice ($p = 0.4896$).

Deficiency in OprF protects P. aeruginosa from NE attack

To assess the contribution of OprF to NE-mediated killing of *P. aeruginosa*, we performed the competition assay as described in *Materials and Methods*. As shown in Table I, the number of CFUs of the bacterial mix of WT *P. aeruginosa* and streptomycin-resistant isogenic mutant OprF⁻ decreased considerably in the presence of NE (Table I, row 1). However, the numbers of CFUs in the presence of streptomycin were insignificantly different in the presence or absence of NE (Table I, row 2). As expected, the deduced numbers of CFUs of WT *P. aeruginosa* indicate ~50% killing of bacteria in the presence of NE (Table I, row 3). As reflected by the competition killing index (CI > 1.74), NE had no apparent effect on the viability of bacteria in the absence of OprF. To confirm that the presence of OprF was required for NE bacterial killing, we incubated WT *P. aeruginosa* and OprF⁻ without or with NE and processed the reactions for NPN membrane permeability assay and SEM. In the presence of NE, strikingly altered morphology and increased Om permeability were observed with WT *P. aeruginosa* (Fig. 3, D and E, and data not shown), but not with the OprF⁻ mutant (Fig. 7, A and B).

The absence of OprF negates the role of NE in host defense against P. aeruginosa

To determine the relevance of this mechanism in vivo, WT and NE^{-/-} mice were i.n. challenged with ~9 × 10⁶ CFUs of OprF⁻ and their survival was monitored over time. While at this bacterial dose, WT *P. aeruginosa* killed ~50% of WT mice and >80% of NE^{-/-} mice (Fig. 1), no death was recorded with OprF⁻ in either NE^{-/-} or WT mice. Also, analysis of BAL fluids found similar total cell and differential counts (data not shown). Interestingly, a 5-fold increase of OprF⁻ inoculum size (5 × 10⁷ CFUs) still did not result in significant death either, whereas WT *P. aeruginosa* at this dose killed 100% of both types of mice (Fig. 7C and data not shown). Thus, the presence of OprF was required for NE-mediated host defense against *P. aeruginosa* lung infection.

Discussion

According to the widely accepted view, NE, a neutrophil-specific serine protease, is deleterious to the host in *P. aeruginosa* infectious diseases. In the present study, we provide for the first time compelling evidence that NE has rather a protective role against *P. aeruginosa* infection. Using a clinically relevant model of pneumonia, targeted deficiency in NE increased the susceptibility of mice to *P. aeruginosa*. When the capacity of mice to clear *P. aeruginosa* was examined, NE^{-/-} mice were less able to contain infection or reduce bacterial burden. Thus, NE plays a relatively important role in host defense against *P. aeruginosa* since apparently other host “weapons” cannot substitute for it in vivo.

The acute inflammatory response to *P. aeruginosa* infection is reportedly characterized by the migration of neutrophils from the pulmonary capillaries into the airspaces (40). In contrast to a series of studies proposing a role for NE in neutrophil transmigration (41–43), the absence of the enzyme did not hamper neutrophil accumulation at the infected site under our experimental conditions. Indeed, our data are in accordance with published reports showing the inconsequential impact of NE on neutrophil migration in infection settings using different pathogens and/or routes of challenge (10, 11, 23). Similarly, the density of alveolar macrophages, another immune cell important for bacterial lung clearance (44), was not affected by NE deficiency. The primary purpose of neutrophil recruitment to infected sites is the rapid clearance of invading bacteria. Comparison of the antibacterial functions of NE^{-/-} and WT neutrophils against *P. aeruginosa* indicated that

phagocytosis and respiratory burst functions were not compromised in NE^{-/-} neutrophils. However, while the numbers of viable bacteria decreased in the presence of both cell types, NE^{-/-} neutrophils exhibited substantially less bactericidal activity than did WT neutrophils. This defect was attributed to the absence of NE, which proved to be directly bactericidal against *P. aeruginosa*.

In determining the mechanism of NE-mediated killing of *P. aeruginosa*, we observed that exposure of bacteria to NE resulted in the loss of their rodlike morphology concomitant with membrane disruption and increased permeability, indicating that the enzyme targets proteins of essential importance to *P. aeruginosa* integrity. *P. aeruginosa*, like most Gram-negative bacteria, contains a thin peptidoglycan overlaid with an Om in which proteins are embedded within a phospholipid bilayer. The outer member protein fraction, although complex, was predominated by a protein that we identified as OprF. OprF represents ~15% of *P. aeruginosa* outer member protein fraction (~2 × 10⁵ copies/cell), making it a major protein of the pathogen (45). Strikingly, NE degraded OprF, coinciding with death of bacteria.

OprF is associated with the underlying peptidoglycan and contributes to the stabilization of the Om as well as exhibiting physiologically relevant porin activity (45–47). Degradation of OprF by NE would therefore explain the observed phenotypic alterations and ensuing death of *P. aeruginosa*. Recently, it was reported that *P. aeruginosa* binds host IFN-γ through OprF, resulting in the quorum-sensing system activation and virulence gene expression (48). This finding suggests that by degrading OprF, NE dampens the ability of *P. aeruginosa* to sense the host immune system activation and to mount an effective virulence response. NE has been previously shown to target directly the virulence factor flagellin (15) and repress its transcription in *P. aeruginosa* by an as yet undefined mechanism (49). Taken together, these observations highlight the capacity of NE to not only kill *P. aeruginosa*, but also to abrogate its virulence. Degradation of OprF by NE may also accentuate *P. aeruginosa* death by other alternative pathways. OprF degradation products could be toxic to *P. aeruginosa*. By cleaving OprF, NE might diffuse inside and degrade proteins important to bacterial survival. Lastly, NE-mediated OprF degradation contributes to efficient host defense against *P. aeruginosa* by altering the pathogen’s membrane permeability, paving the way to other neutrophil antibacterial molecules for further damage and death.

A model of OprF arrangement in *P. aeruginosa* Om has been proposed wherein β-sheets cross the membrane and are interconnected in part by conserved surface-exposed loops (33). Interestingly, inspection of OprF primary structure revealed various preferred NE cleavage peptide bonds, some of which were likely to be cell surface-localized based on the proposed OprF secondary structure model (50). That NE degrades OprF was further confirmed following incubation of neutrophils with Om containing OprF or live bacteria with NE. Taken together, these findings suggest that NE could encounter and degrade OprF in vivo. Importantly, in this study NE was used at concentrations below its physiological levels, which have been reported to exceed the millimolar range (8, 51).

In vivo, NE could target OprF inside the phagocytic vacuole where bacteria are trapped. In support of this possibility, NE has been shown to surround bacteria engulfed inside the phagolysosome and degrade their virulence factors (13, 14). Alternatively, degradation of OprF could occur extracellularly through NE released by degranulation. There is accumulating evidence that microbial challenge is associated with not only extracellular release of free active NE (23, 35), but also with the production of chromatin-based structures containing NE. These

structures, termed neutrophil extracellular traps, capture and target invading pathogens and/or their virulence factors (52). While phagocytosis represents the main antibacterial function of neutrophils, the relative importance of free or neutrophil extracellular trap-associated NE in host defense against *P. aeruginosa* remains to be determined. Based on our NE inhibition data, the extracellular degradation of OprF in vivo will be determined by the balance of active NE and its physiologic inhibitors (specific and nonspecific).

Incomplete inhibition of neutrophil-mediated degradation of OprF suggests some contributions of other proteases. With respect to neutrophil serine protease family, it seems likely that proteinase 3 would contribute to OprF degradation since SLPI does not inhibit this enzyme and cathepsin G does not degrade OprF. Coincidentally, a recent study showed that cathepsin G was not required for host defense against *P. aeruginosa* in a mouse model of *Pseudomonas* endobronchitis (53). Whether proteinase 3 kills *P. aeruginosa* and contributes to host protection, however, is unknown. Generation of mice deficient in all three serine proteases is underway and should enhance our understanding about the relative contributions of individual enzymes in protecting the host from *P. aeruginosa*.

The finding that NE degrades OprF to kill *P. aeruginosa*, including the two pneumonia isolates, is of importance. It reinforces the hypothesis that NE mediates maximal neutrophil killing of Gram-negative bacteria by targeting these latter's major Omps and cleaving perhaps common surface-exposed epitopes (13, 54). The major Om protein OprF may then represent a target in the design of therapeutic strategies against *P. aeruginosa*. However, since *P. aeruginosa* is known to change its phenotype, further studies using clinical strains isolated from various infection settings are awaited to determine whether a correlation between the susceptibility of these strains to NE attack and the expression of OprF could be established. In recent years, several studies proposed that NE has the capacity to modulate biologic activities of various inflammatory mediators (55). It would be of interest to investigate the relative importance of this aspect in host defense against *P. aeruginosa*.

As mentioned earlier, NE is a potent enzyme and is regarded as the prime suspect in the destructive activities in *P. aeruginosa* infections, casting doubt on the enzyme's beneficial role. Collectively, the findings of this work clearly demonstrate that NE mediates innate host protection against *P. aeruginosa*, at least in mice. As such, strategies aimed at controlling excessive neutrophil recruitment and/or activation (e.g., NE release) in response to *P. aeruginosa* infection should be considered. In the same token, the inhibition of NE to treat *P. aeruginosa*-associated tissue destructive diseases should be reconsidered taking into account the enzyme's antibacterial function.

Acknowledgments

We thank Dr. Alexandre A. Todorov for statistical analysis and S. Bahr for his excellent technical assistance.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Mizgerd, J. P. 2008. Acute lower respiratory tract infection. *N. Engl. J. Med.* 358: 716–727.
- Boxer, L. A., and R. A. Blackwood. 1996. Leukocyte disorders: quantitative and qualitative disorders of the neutrophil, part 2. *Pediatr. Rev.* 17: 47–50.
- Boxer, L. A. 2003. Neutrophil abnormalities. *Pediatr. Rev.* 24: 52–62.
- Dale, D. C., T. E. Cottle, C. J. Fier, A. A. Bolyard, M. A. Bonilla, L. A. Boxer, B. Cham, M. H. Freedman, G. Kannourakis, S. E. Kinsey, et al. 2003. Severe chronic neutropenia: treatment and follow-up of patients in the Severe Chronic Neutropenia International Registry. *Am. J. Hematol.* 72: 82–93.
- Hampton, M. B., A. J. Kettle, and C. C. Winterbourn. 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92: 3007–3017.
- Ganz, T. 1999. Oxygen-independent microbicidal mechanisms of phagocytes. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 111: 390–395.
- Bode, W., E. Meyer, Jr., and J. C. Powers. 1989. Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry* 28: 1951–1963.
- Liou, T. G., and E. J. Campbell. 1995. Nonisotropic enzyme-inhibitor interactions: a novel nonoxidative mechanism for quantum proteolysis by human neutrophils. *Biochemistry* 34: 16171–16177.
- Belaouaj, A., B. C. Walsh, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, and S. D. Shapiro. 1997. Characterization of the mouse neutrophil elastase gene and localization to chromosome 10. *Mamm. Genome* 8: 5–8.
- Belaouaj, A., R. McCarthy, M. Baumann, Z. Gao, T. J. Ley, S. N. Abraham, and S. D. Shapiro. 1998. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against Gram negative bacterial sepsis. *Nat. Med.* 4: 615–618.
- Tkalcevic, J., M. Novelli, M. Phylactides, J. P. Iredale, A. W. Segal, and J. Roes. 2000. Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity* 12: 201–210.
- Reeves, E. P., H. Lu, H. L. Jacobs, C. G. Messina, S. Bolsover, G. Gabella, E. O. Potma, A. Warley, J. Roes, and A. W. Segal. 2002. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* 416: 291–297.
- Belaouaj, A., K. S. Kim, and S. D. Shapiro. 2000. Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science* 289: 1185–1188.
- Weinrauch, Y., D. Drujan, S. D. Shapiro, J. Weiss, and A. Zychlinsky. 2002. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature* 417: 91–94.
- Lopez-boado, Y. S., M. Espinola, S. Bahr, and A. Belaouaj. 2004. Neutrophil serine proteinases cleave bacterial flagellin, abrogating its host response-inducing activity. *J. Immunol.* 172: 509–515.
- Sadikot, R. T., T. S. Blackwell, J. W. Christman, and A. S. Prince. 2005. Pathogen-host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 171: 1209–1223.
- Lyczak, J. B., C. L. Cannon, and G. B. Pier. 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.* 2: 1051–1060.
- Gibson, R. L., J. L. Burns, and B. W. Ramsey. 2003. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168: 918–951.
- Kurahashi, K., O. Kajikawa, T. Sawa, M. Ohara, M. A. Gropper, D. W. Frank, T. R. Martin, and J. P. Wiener-Kronish. 1999. Pathogenesis of septic shock in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J. Clin. Invest.* 104: 743–750.
- Chastre, J., and J. Y. Fagon. 2002. Ventilator-associated pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165: 867–903.
- Garau, J., and L. Gomez. 2003. *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 16: 135–143.
- Park, D. R. 2005. The microbiology of ventilator-associated pneumonia. *Respir. Care* 50: 742–763.
- Hirche, T. O., J. J. Atkinson, S. Bahr, and A. Belaouaj. 2004. Deficiency in neutrophil elastase does not impair neutrophil recruitment to inflamed sites. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30: 576–584.
- Meyer, K. C., and J. Zimmerman. 1993. Neutrophil mediators, *Pseudomonas*, and pulmonary dysfunction in cystic fibrosis. *J. Lab. Clin. Med.* 121: 654–661.
- Lee, W. L., and G. P. Downey. 2001. Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 164: 896–904.
- Moraes, T. J., C. W. Chow, and G. P. Downey. 2003. Proteases and lung injury. *Crit. Care Med.* 31: 189–194.
- Birrer, P. 1995. Proteases and antiproteases in cystic fibrosis: pathogenetic considerations and therapeutic strategies. *Respiration* 62: 25–28.
- Boxio, R., C. Bossenmeyer-Pourie, N. Steinckwich, C. Doumon, and O. Nusse. 2004. Mouse bone marrow contains large numbers of functionally competent neutrophils. *J. Leukocyte Biol.* 75: 604–611.
- Woodruff, W. A., and R. E. Hancock. 1988. Construction and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* protein F-deficient mutants after in vitro and in vivo insertion mutagenesis of the cloned gene. *J. Bacteriol.* 170: 2592–2598.
- Achilefu, S., R. B. Dorshow, J. E. Bugaj, and R. Rajagopalan. 2000. Novel receptor-targeted fluorescent contrast agents for in vivo tumor imaging. *Invest. Radiol.* 35: 479–485.
- Hirche, T. O., J. P. Gaut, J. W. Heinecke, and A. Belaouaj. 2005. Myeloperoxidase plays critical roles in killing *Klebsiella pneumoniae* and inactivating neutrophil elastase: effects on host defense. *J. Immunol.* 174: 1557–1565.
- Molloy, M. P., B. R. Herbert, M. B. Slade, T. Rabilloud, A. S. Nouwens, K. L. Williams, and A. A. Gooley. 2000. Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur. J. Biochem.* 267: 2871–2881.
- Finnen, R. L., N. L. Martin, R. J. Siehnel, W. A. Woodruff, M. Rosok, and R. E. Hancock. 1992. Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane protein OprF by use of truncated OprF derivatives and monoclonal antibodies. *J. Bacteriol.* 174: 4977–4985.
- Nouwens, A. S., S. J. Cordwell, M. R. Larsen, M. P. Molloy, M. Gillings, M. D. Willcox, and B. J. Walsh. 2000. Complementing genomics with proteomics: the membrane subproteome of *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Electrophoresis* 21: 3797–3809.

35. Hirche, T. O., E. C. Crouch, M. Espinola, T. J. Brokelman, R. P. Mecham, N. DeSilva, J. Cooley, E. Remold-O'Donnell, and A. Belaouaj. 2004. Neutrophil serine proteinases inactivate surfactant protein D by cleaving within a conserved subregion of the carbohydrate recognition domain. *J. Biol. Chem.* 279: 27688–27698.
36. Lee, R. P., S. W. Doughty, K. Ashman, and J. Walker. 1996. Purification of hydrophobic integral membrane proteins from *Mycoplasma hyopneumoniae* by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 737: 273–279.
37. Lau, G. W., S. Haataja, M. Lonetto, S. E. Kensit, A. Marra, A. P. Bryant, D. McDevitt, D. A. Morrison, and D. W. Holden. 2001. A functional genomic analysis of type 3 *Streptococcus pneumoniae* virulence. *Mol. Microbiol.* 40: 555–571.
38. Loh, B., C. Grant, and R. F. Hancock. 1984. Use of the fluorescent probe 1-*N*-phenylnaphthylamine to study the interactions of aminoglycoside antibiotics with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26: 546–551.
39. Hancock, R. E., and P. G. Wong. 1984. Compounds which increase the permeability of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *Antimicrob. Agents Chemother.* 26: 48–52.
40. Mizgerd, J. P. 2002. Molecular mechanisms of neutrophil recruitment elicited by bacteria in the lungs. *Semin. Immunol.* 14: 123–132.
41. Delclaux, C., C. Delacourt, M. P. D'Ortho, V. Boyer, C. Lafuma, and A. Harf. 1996. Role of gelatinase B and elastase in human polymorphonuclear neutrophil migration across basement membrane. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 14: 288–295.
42. Owen, C. A., M. A. Campbell, P. L. Sannes, S. S. Boukedes, and E. J. Campbell. 1995. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *J. Cell Biol.* 131: 775–789.
43. Cepinskas, G., M. Sandig, and P. R. Kviety. 1999. PAF-induced elastase-dependent neutrophil transendothelial migration is associated with the mobilization of elastase to the neutrophil surface and localization to the migrating front. *J. Cell Sci.* 112: 1937–1945.
44. Kooguchi, K., S. Hashimoto, A. Kobayashi, Y. Kitamura, I. Kudoh, J. Wiener-Kronish, and T. Sawa. 1998. Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect. Immun.* 66: 3164–3169.
45. Woodruff, W. A., T. R. Parr, Jr., R. E. Hancock, L. F. Hanne, T. I. Nicas, and B. H. Iglewski. 1986. Expression in *Escherichia coli* and function of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F. *J. Bacteriol.* 167: 473–479.
46. Gotoh, N., H. Wakebe, E. Yoshihara, T. Nakae, and T. Nishino. 1989. Role of protein F in maintaining structural integrity of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *J. Bacteriol.* 171: 983–990.
47. Brinkman, F. S., M. Bains, and R. E. Hancock. 2000. The amino terminus of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein OprF forms channels in lipid bilayer membranes: correlation with a three-dimensional model. *J. Bacteriol.* 182: 5251–5255.
48. Wu, L., O. Estrada, O. Zaborina, M. Bains, L. Shen, J. E. Kohler, N. Patel, M. W. Musch, E. B. Chang, Y. X. Fu, et al. 2005. Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 309: 774–777.
49. Sonawane, A., J. Jyot, R. Daring, and R. Ramphal. 2006. Neutrophil elastase, an innate immunity effector molecule, represses flagellin transcription in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 74: 6682–6689.
50. Rawling, E. G., N. L. Martin, and R. E. Hancock. 1995. Epitope mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane porin protein OprF. *Infect. Immun.* 63: 38–42.
51. Bieth, J. G. 1986. Elastases: catalytic and biological properties. In *Regulation of Matrix Accumulation*. R. Mecham, ed. Academic Press, New York, pp. 2228–2232.
52. Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532–1535.
53. Sedor, J., L. Hogue, K. Akers, S. Boslaugh, J. Schreiber, and T. Ferkol. 2007. Cathepsin-G interferes with clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from mouse lungs. *Pediatr. Res.* 61: 26–31.
54. Woodruff, W. A., and R. E. Hancock. 1989. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F: structural role and relationship to the *Escherichia coli* OmpA protein. *J. Bacteriol.* 171: 3304–3309.
55. Pham, C. T. 2006. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 6: 541–550.

Cette étude nous a permis de démontrer les points suivants :

- (1) Les souris NE^{-/-} présentent un taux de mortalité et de morbidité supérieur à celui des souris WT suite à une infection intra-nasale par la souche H103 du pathogène *P. aeruginosa*.
- (2) La NE est dotée d'une activité bactéricide directe contre *P. aeruginosa* ceci a été montré en utilisant la souche de laboratoire H103 ainsi que deux souches cliniques isolées chez des patients atteints de pneumonies.
- (3) L'activité antibactérienne des neutrophiles déficients en NE est atténuée comparativement à celle observée avec des neutrophiles sauvages.
- (4) La NE cible *P. aeruginosa* en dégradant sa protéine membranaire majeure F (OprF). Cette dégradation est dépendante du temps et de la concentration en NE.
- (5) La souche de *P. aeruginosa* déficiente en OprF (OprF^{-/-}) n'est pas létale pour les souris WT et NE^{-/-}.

L'ensemble de ces résultats démontre pour la première fois, le rôle important de la NE dans la protection de l'hôte contre les infections respiratoires à *P. aeruginosa*.

L'étude du mécanisme antibactérien de la NE nous a permis de montrer que l'enzyme dégrade la protéine membranaire majeure F (OprF) de *P. aeruginosa*, porine qui joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité structurale de cette bactérie et dans la reconnaissance et l'activation du système immunitaire de l'hôte.

Article 2

Neutrophil elastase mediates the regulation of cytokines in the setting of *Pseudomonas aeruginosa* lung infection

Rym Benabid, Julien Wartelle, Guyot Nicolas, Laurent Leroy, François

Lebargy, Sophie C Gangloff, and Azzaq Belaoaouaj

(En cours de soumission)

L'élastase du neutrophile module l'expression des cytokines dans le cas des infections pulmonaires à *Pseudomonas aeruginosa*

La réponse immunitaire innée est une réaction physiologique permettant à l'hôte de se protéger contre les agents infectieux. Cette réaction est caractérisée par l'expression de médiateurs inflammatoires qui assurent le recrutement de cellules immunitaires au site de l'infection afin d'éradiquer l'agent pathogène. Dans le cas d'infections pulmonaires bactériennes, l'interaction de l'agent envahisseur avec les cellules hôtes résulte en une cascade de signalisation aboutissant à la production de chimiokines et cytokines capables d'activer les cellules immunitaires. Ainsi, les neutrophiles sont les premières cellules immunitaires recrutées au site de l'infection. Ces cellules sont des phagocytes efficaces capables d'éliminer le pathogène grâce à leur activité bactéricide qui repose sur deux systèmes : un système oxydatif et un système non oxydatif (Hampton M.B *et al.*, 1998 ; Ganz T *et al.*, 1999).

Le système non oxydatif du neutrophile repose sur l'activité de ses trois sérine-protéase : la CG, la PR3 et la NE. L'activité de ces enzymes antimicrobienne est due à la triade catalytique : His-Asp-Ser où la Serine est le résidu actif (Bode W *et al.*, 1989).

La NE, une glycoprotéine cationique, est stockée dans les granules azurophiles du neutrophile à des concentrations excédants le taux du millimolaire (Liou T.G *et al.*, 1995). Les études menées sur les souris déficientes en NE (NE^{-/-}) ont permis de montrer que cette enzyme contribue à la protection de l'hôte contre les infections microbiennes. En effet, suite à une infection, les neutrophiles relarguent les sérine-protéase, entre autre la NE, à l'intérieur du phagolysosome afin d'éliminer le pathogène. La NE dégrade les protéines de la membrane externe de la bactérie, protéines nécessaires au maintien de l'intégrité bactérienne (Belaouaj A *et al.*, 2000 ; Hirche T.O *et al.*, 2008). La NE est capable également d'atténuer le pouvoir pathogène des bactéries en ciblant leurs facteurs de virulence (Weinrauch Y *et al.*, 2002 ; Lopez-bado Y.S *et al.*, 2004).

L'infection microbienne est associée avec une sécrétion de la NE active. Cette sérine protéase a été considérée depuis longtemps comme une enzyme destructive et néfaste au tissu inflammatoire dans le cas d'infection à *P. aeruginosa*. Cet effet destructeur est la conséquence

de l'échappement de la NE à ses inhibiteurs physiologiques. Cependant, on a montré récemment que la NE contribue considérablement à l'activité bactéricide du neutrophile contre *P. aeruginosa* et ainsi à la protection de l'hôte contre cette bactérie dans un modèle clinique d'infection pulmonaire aigüe. La NE dégrade la protéine majeure OprF de la membrane externe de *P. aeruginosa* conduisant à une perte de la structure bactérienne et à la mort du pathogène.

Le rôle de la NE dans la défense de l'hôte contre *P. aeruginosa* semble être plus complexe qu'une simple dégradation des protéines structurales de la bactérie, d'où notre intérêt au rôle inflammatoire de la NE dans les infections pulmonaires à *P. aeruginosa* (Hirche T.O *et al.*, 2008).

En utilisant les souris NE^{-/-}, dans un modèle clinique de pneumonie à *P. aeruginosa*, nous avons montré que l'enzyme contribue à la régulation de l'inflammation pulmonaire causée par le pathogène *P. aeruginosa*. Nos résultats indiquent que la déficience en NE est associée à une diminution à un niveau protéique et transcriptionnel des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , MIP-2 et l'IL-6 au niveau des poumons. L'importance de la NE dans la régulation de l'expression des cytokines a été confirmée suite à l'exposition des macrophages (lignée cellulaire et macrophages *ex vivo*) à cette enzyme.

L'ensemble de ces résultats montrent pour la première fois que la NE ne cible pas uniquement les bactéries et leurs facteurs de virulence mais possède également la capacité de réguler la réaction inflammatoire associée.

**Neutrophil Elastase Mediates the Regulation of Cytokine Expression in the Setting of
Pseudomonas aeruginosa Lung Infection**

Rym Benabid¹, Julien Wartelle¹, Nicolas Guyot¹, Laurent Leroy¹, Rachel Boxio¹,
François Lebargy¹, Sophie C Gangloff¹, and Azzaq Belaouaj^{1,2, Ψ}

¹Inserm Avenir Program, EA 4303 «Inflammation and Immunity of the Respiratory Epithelium», CHU de Reims, Maison Blanche, IFR 53, Reims 51092 Cedex France.

²**Corresponding Author:** Azzaq Belaouaj, EA4303, 45, Rue Cognacq Jay, Reims, 51092 Cedex France, Tel.: 33-3-26-78-39-06; Fax: 33-3-26-06-58-61, E-mail: azzaq.belaouaj@univ-reims.fr

Running title: Neutrophil elastase regulates lung inflammation

Keywords: Neutrophils - Neutrophil elastase - Bacterial Infections - *Pseudomonas aeruginosa*
- Lung - Transgenic/Knockout Mice

^Ψ This work was supported by grants from Conseil Régional Champagne-Ardenne, Inserm Avenir Program (RB and AB), FRM, and ANR (AB)

ABSTRACT

There is accumulating evidence that microbial challenge is associated with the extracellular release of free active NE. As a result of its potent soluble and insoluble substrate-degrading capacity, NE has been always considered as “a prime suspect” in *P. aeruginosa*-associated inflammatory and tissue-destructive diseases. However, we provided recently compelling evidence that NE contributes considerably to neutrophil-mediated host protection in a *P. aeruginosa* pneumonia model. Interestingly, a number of studies about the extracellular functions of NE in inflamed situations suggest that the enzyme’s role in host defense against *P. aeruginosa* might be more complex than simple killing of bacteria. Using NE-deficient mice in a clinically relevant mouse model of *P. aeruginosa* pneumonia, we demonstrate that the enzyme contributes to the regulation of lung inflammation triggered by this pathogen. Our data indicate that the absence of NE was associated with decreased protein and transcript levels of pro-inflammatory cytokines TNF- α , MIP-2 and IL-6 in the lung. The importance of NE-mediated regulation of cytokine expression was further confirmed following exposure of macrophages (cell line-derived or peritoneum-elicited macrophages) to NE. Taken together, these studies show for the first time that NE not only targets bacteria and/or their virulence factors (inside or outside the PMN) in the setting of lung infection, but the extracellular enzyme has the capacity to regulate the associated inflammation. As such, strategies aimed at inhibiting NE in tissue-destructive diseases (e.g., in the setting of *P. aeruginosa* lung infection) should take into account the enzyme’s regulatory role of inflammation.

INTRODUCTION

Innate immune response is a physiological reaction of the host to protect itself from insulting agents such as invading pathogens. This complex and dynamic process relies in part on the coordinated expression of inflammatory mediators and recruitment of immune cells with the ultimate goal to rid the host of pathogens and resolve the associated inflammation.

In the setting of respiratory bacterial infections (e.g., bacterial pneumonia), interaction of invading microbes with host cell receptors (e.g., toll-like receptor (TLR)), results in a cascade of signalling events and production of chemokines/cytokines, which call in and/or activate immune cells (1). In this regard, the predominance of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) at the site of infection represents a characteristic feature of innate immune response especially when the first lines of host defense are breached (2). PMNs are efficient phagocytes whose main function is thought to be the clearance of bacteria. The cells are equipped with a myriad of antimicrobial molecules grouped into oxidative and non-oxidative systems (3,4).

Regarding the non oxidative system, we and others have identified the PMN specific serine protease, neutrophil elastase (NE), as a key antimicrobial enzyme (5,6). Like its family members cathepsin G (CG) and proteinase 3 (PR3), NE catalytic activity relies on the His⁵⁷-Asp¹⁰²-Ser¹⁹⁵ triad (chymotrypsin numbering system) where Ser represents the active residue (7). NE, a cationic glycoprotein, is stored in readily active form in neutrophil primary granules at concentrations exceeding millimolar range making it a major component of neutrophils (8). Gene targeting of NE in mice revealed that the enzyme contributes significantly to host protection against microbial infections (5,6). Following bacterial uptake, PMNs discharge rapidly NE inside the phagolysosome to combat bacteria (9). In determining

NE-mediated defense against Gram-negative bacteria, we found that the enzyme degrades the major outer membrane proteins (omps), structural proteins localized on the cell wall (9,10). NE has also the capacity to attenuate the pathogenicity of invading microbes by targeting their virulence factors (11,12).

There is accumulating evidence that microbial challenge is associated with the extracellular release of free active NE (13,14). As a result of its potent soluble and insoluble substrate-degrading capacity, NE has been always considered as “a prime suspect” in *P. aeruginosa*-associated tissue- inflammatory and destructive diseases. In support of this, the traditional thinking is that NE surpasses the lung’s inhibitory shield to block the enzyme. However, we provided recently compelling evidence that NE contributes considerably to neutrophil-mediated host protection in a *P. aeruginosa* pneumonia model (10). Interestingly, a number of studies about the extracellular functions of NE in inflamed situations (15) suggest that the enzyme’s role in host defense against *P. aeruginosa* might be more complex than simple killing of bacteria. Altogether, these observations prompted us to investigate the role of extracellular NE in *P. aeruginosa* infection-associated lung inflammation.

Using NE-deficient mice in a clinically relevant mouse model of *P. aeruginosa* pneumonia, we demonstrate that the enzyme contributes to the regulation of lung inflammation triggered by this pathogen. Our data indicate that the absence of NE was associated with decreased protein and transcript levels of pro-inflammatory cytokines TNF- α , MIP-2 and IL-6 in the lung. The importance of NE-mediated regulation of cytokine expression was further confirmed following exposure of macrophages (cell line-derived or primary macrophages) to NE. Taken together, these studies show for the first time that NE not only targets bacteria

and/or their virulence factors (inside or outside the PMN) in the setting of lung infection, but the extracellular enzyme has the capacity to regulate the associated inflammation.

MATERIELS AND METHODS

Reagents. Purified NE and elastin were obtained from Elastin Products Company (EPC, Owensville, MO). NE activity was determined spectrophotometrically using the specific chromogenic substrate N-methoxysuccinyl-Al-Al-Pro-Val-pNA (EPC) according to the manufacturers recommendations. Recombinant human secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) was purchased from R&D Systems (Minneapolis, MI). *Pseudomonas aeruginosa* LPS was purchased from Sigma-Aldrich. RPMI-1640 medium, DMEM medium, foetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin, PBS was obtained from Gibco (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France). Pentobarbital sodique were obtained from CEVA Santé Animale. Primers for Semi-quantitative and Real time RT-PCR were purchased from Operon Biotechnologies (Cologne, Germany). SYBR green for real time RT-PCR was obtained from Invitrogen. All other chemicals were reagent grade and purchased from Sigma-Aldrich, unless otherwise stated.

Mice. NE-deficient (NE^{-/-}) mice were generated by targeted mutagenesis as previously described (5). NE^{-/-} mice and their wild-type (WT) littermates and C3H/HeJ (TLR4^{-/-}) and control C3H/HeN mice (Harlan Laboratories) were used in this study. Of note, C3H/HeJ mice have a naturally non responsive TLR4. Mice were sex and age (8-10 weeks) matched and maintained in the animal barrier facility with a 12-h light/dark cycle and provided with water and food *ad libitum*. Animal handling and procedures were approved by the Animal Studies Committee at our institution.

Bacteria and intranasal infection. *Pseudomonas aeruginosa* H103 was kindly provided by Dr. Hancock (Vancouver, BC, Canada). An overnight bacterial culture (1 ml) were grown in Luria Bertani broth (10 ml) at 37°C to late exponential phase (3h). Bacteria were washed

twice with PBS (pH 7.4) and the optical density (OD) of the cultures determined at 600 nm ($OD_{600\text{ nm}} \approx 1 \times 10^9$ bacteria/ml).

NE^{-/-} and WT mice (n = 20 mice/genotype) were anesthetized by intraperitoneal (i.p) injection of ketamine hydrochloride (75 mg/kg) and medetomidine hydrochloride (1 mg/kg). Next, mice were challenged intranasally (i.n) with 50µl sterile saline buffer (PBS) alone or containing *P. aeruginosa* H103 (10^7 CFUs/per mouse) (10). Mice were sacrificed at designated time points (4, 12 and 24h post-infection) and their lungs lavaged *in situ* using 1 ml of PBS, pH 7.4, cycled three times (16). Identical recoveries of lavage (700 ml/mouse) were obtained for each of the experimental groups. Both bronchoalveolar lavage fluids (BAL) and recovered lungs were processed for analysis as described below.

Lung histology and BAL cell counts. Mouse lungs were processed for histology 24h post-challenge (17). Briefly, the lungs were inflated with 10% buffered formalin at a constant pressure of 25 cm H₂O for 15 min. Next, the lungs were excised, immersion-fixed with 10% buffered formalin for 24-48h, dehydrated, embedded in paraffin, and cut into 5 µm sections. Serial lung tissue sections were processed, stained with hematoxylin and eosin (H&E), and examined by light microscopy. Cell counts from BAL fluids were immediately performed by hemacytometer. For differential counts, cells were cytopun, Wright stained and identified using standard morphological criteria. The remaining BAL samples were centrifuged for 10 min at 4°C and supernatants were snap-frozen and stored at -80°C until use.

Cell cultures. Mouse macrophage derived from the cell line J774 were seeded on a 24 well plate (ATGC Biotechnologies SA, Marne-la-Vallée, France) at 1×10^5 cells/well and grown for three days to confluence at 37°C in 5% CO₂ in DMEM medium supplemented with 1% foetal bovine serum (FBS) and 1% penicillin/streptomycin (18). In separate experiments,

macrophages were attracted to the peritonea of C3H/HeJ (TLR4^{-/-}) and control C3H/HeN mice following intraperitoneal (i.p.) injection with 3 ml of 3% Brewer thioglycolate broth (Difco Laboratories, Detroit) (19). Four days later, mice were sacrificed. Cells were harvested by lavaging the peritoneal cavities with 10 ml of RPMI-1640 (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France), washed twice in RPMI-1640 and resuspended in the medium supplemented with 1% autologous serum. Macrophages represented > 95% of the cell population and > 98% were viable as judged by differential counting and trypan blue dye exclusion respectively. Cells were seeded on a 24 well tissue culture plate at 5×10^5 cells/well, incubated for 4h at 37°C in 5% CO₂ to allow macrophages to adhere and then, washed twice with 1 ml of medium to remove non-adherent cells.

Exposure of cells to purified NE. Prior to NE treatment, cell line-derived or primary macrophages were washed twice with 1 ml PBS and cultured for 1h with serum-free corresponding medium. In dose response and time course experiments, cells were treated with various concentrations of NE (100, 300, 500 nM) for one hour, washed twice with 1 ml PBS and cultured at 37°C in 5% CO₂ in fresh complemented medium for different periods of time (0, 1, 2, 4, 12, and 24h). To ensure maximal removal of NE, culture media was tested against NE specific substrate (20). In some experiments, NE was preincubated with SLPI for 5 min at 37°C prior to addition to cells. Controls included cells cultured in the absence of NE. Under these experimental conditions, over 90% of the cells were alive, as judged by morphologic criteria and trypan blue dye exclusion.

Custom mouse cytokine antibody array. Determination of cytokines levels in cell-free BAL fluids of WT et NE^{-/-} mice at time points 12h and 24h (n=4/genotype/time point) was performed using custom mouse cytokine antibody microarray according to the manufacturer's

instructions (Ray Biotech, Tebu-Bio, Le Perray-en-Yvelines, France) (21). Briefly, equal volumes of cell-free BAL fluids (400 μ l) were added to antibody-coated membranes and detection of immunoreactive cytokine was carried out following incubation of the membranes with streptavidin–horseradish peroxidase biotinylated-antibody complex and visualisation by enhanced chemiluminescence. Images were obtained with a ChemiDoc XRS imaging system (Bio-Rad). Densitometric analysis was performed on captured images using Quantity One 1-D analysis Software (version 4.5.2) (Bio-Rad). Spots of interest were normalized to an internal control after subtraction of representative background sample.

Bio-Plex cytokine assay. Equal volumes of cell-free BAL fluids (50 μ l) were processed to determine cytokine concentrations of TNF- α , MIP-2, and IL-6 using a multiplex bead-based immunoassay kit (Bio-Rad). Cytokine assays were performed as described by the manufacturer's protocol. Each reaction in the kit was performed in triplicate with the experiment repeated three times.

Immunoblotting. NE antigen was detected by Western blotting (17). Briefly, cell-free BAL fluids (10 μ l) were resolved by SDS-PAGE under reducing conditions and transferred to PVDF membranes (Millipore Corp., Bedford, Massachusetts, USA). The membranes were sequentially incubated with rabbit polyclonal antibody to mouse NE (dilution, (dilution, 1:2,000) followed by goat anti-rabbit horseradish peroxidase. Immunoreactive fragments were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Biosciences, Piscataway, New Jersey, USA).

Elastin zymography. NE activity was determined by κ -elastin-zymography (17). Briefly, cell-free BAL fluids (10 μ l) were electrophoresed under non-reducing conditions at 4°C on

12% SDS-PAGE gels containing 1 mg/ml elastin. Following electrophoresis, gels were soaked in 2.5% Triton X-100 for 30 min, rinsed briefly, and incubated at 37°C for 48 h in 50 mM Tris HCl (pH 8.2), containing 5 mM CaCl₂. The gels were then stained with Coomassie blue and destained in 5% acetic acid and 10% methanol. Active NE appears as a transparent lysis band at ~30 kDa. NE activity in cell-free BAL fluids was further confirmed using conventional chromogenic peptide assays as described above.

RNA extraction and Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Total RNA isolation was performed using MasterPureTM RNA Purification kit as described by the manufacturer's protocol (Epicentre, Biotechnologies) (12). Briefly, mouse lung tissues (half lobe) and cells pellets were lysed and RNA was extracted. Purified RNA was resuspended in RNase inhibitor-containing TE Buffer. RNA concentration and purity were determined by spectrophotometry (A260/A280 ratio). Integrity of RNA samples was verified by electrophoresis on 2% agarose gels and visualization under UV light .

The pro-inflammatory cytokine expression was determined by RT-PCR. Total RNA (1 µg) samples were reverse-transcribed using (Invitrogen Life Technologies). Next, cDNAs were amplified by PCR using specific primers (40 cycles starting with DNA denaturation for 2min at 94°C; each cycle corresponded to denaturation for 15s at 94°C, primer annealing at 60°C for 30s and extension at 72°C for 30s). Levels of cytokine mRNA transcripts were normalized to the internal control 28 S mRNA. RT-PCR products were analyzed by electrophoresis on 1.2 % agarose gels and quantified by densitometry using Quantity One Software (Bio-Rad).

Forward and reverse primers for TNF- α , MIP-2, IL-6, and 28 S were designed as follows:

TNF- α forward: 5'-GGG-ACA-GTG-ACC-TGG-ACT-GT-3'; **TNF- α reverse:** 5'-CTC-CCT-TTG-CAG-AAC-TCA-GC-3'; **MIP-2 forward:** 5'-CCA-CTC-TCA-AGG-GCG-GTC-AA-3'; **MIP-2 reverse:** 5'-CCC-CTT-ATC-CCC-AGT-CTC-TTT-CAC-3'; **Il-6 forward:** 5'-

GAT-GCT-ACC-AAA-CTG-GAG-ATA-AAT-C -3'; **IL-6 reverse:** 5'-GGT-CCT-TAG-CCA-CTC-CTT-CTG-TG -3'; **28 S forward:** 5'-CGG-AAT-TCG-CCA-CCA-GCC-GCC-TG-3'; **28 S reverse:** 5'-CGT-CTA-GAC-TTT-CTC-CGT-TTA-CTT-GC -3'.

Real time RT-PCR. Briefly, total RNA was reverse-transcribed into cDNA using SuperScript First strand Synthesis System (Invitrogen Life Technologies). Next, real-time PCR amplification was performed on the ABI PRISM™ 7500 Sequence Detection System (PE Applied Biosystems) using SYBR® Green PCR Master Mix (PE Applied Biosystems). PCR amplification conditions were as follows: initial DNA denaturation for 5 min at 94°C, primer annealing at 60°C for 1 min and extension at 72°C for 1 min for a total 40 cycles. Data analysis was performed with the SDS Software (Applied Biosystems).

Forward and reverse primers for TNF- α , MIP-2, IL-6, and 28 S were designed as follows:

TNF- α forward: 5'-GGC-AGG-TTC-TGT-CCC-TTT-CA-3'; **TNF- α reverse:** 5'-CTG-TGC-TCA-TGG-TGT-CTT-TTC-TG -3'; **MIP-2 forward:** 5'-GTG-AAC-TGC-GCT-GTC-AAT-GC -3'; **MIP-2 reverse:** 5'-ACT-CAA-GCT-CTG-GAT-GTT-CTT-GAA-3'; **IL-6 forward:** 5'-CAA-CCA-CGG-CCT-TCC-CTA-CT A -3'; **IL-6 reverse:** 5'-GTT-GGG-AGT-GGT-ATC-CTC-TGT-GA-3'; **GAPDH forward:** 5'-CAG-CCT-CGT-CCC-GTA-GAC-AA-3'; **GAPDH reverse:** 5'-CCC-AAT-ACG-GCC-AAA-TTC-G-3'.

Statistical Analysis. Unless specified, data of experiments are expressed as mean \pm SD. Where appropriate, statistical differences between groups were tested using Student's unpaired t-test. Statistical significance was assumed at a predefined level of $\alpha < 0.05$.

RESULTS

Neutrophils migrate normally and independently of NE in response to *P. aeruginosa* lung infection. WT and NE^{-/-} mice were intranasally challenged with 10⁷ CFUs of *P. aeruginosa* H103 (representing ~ the LD₅₀ for WT mice, 10) and sacrificed 4, 12 and 24h post-infection. By 6h post-infection, NE^{-/-} mice exhibited signs of severe distress, which were less obvious in WT mice. No death was recorded in WT and NE^{-/-} mice at time points 4 and 12 h. However, over 60 % of NE^{-/-} mice, but none of WT mice, died by 24h. These data corroborate those of our recent studies (10) further confirming the relative importance of NE in host defense against *P. aeruginosa* lung infection. Lung tissues and BAL fluids obtained from saline-instilled WT and NE^{-/-} mice had normal histology and resident cells (data not shown). Analysis of lung tissue sections of the surviving mice 24h post-infection showed similar patchy cellular infiltrates in WT and NE^{-/-} mice (Fig. 1A). While there was a sharp increase of the cellularity in infected WT and NE^{-/-} BAL fluids in function of time, cell counts were comparable in both genotypes at all time points post-challenge (4, 12, and 24h) (Fig. 1B). Morphologic analysis of BAL cytopins revealed the predominance of neutrophils in both types of BAL fluids (Fig. 1C). Together, these data demonstrate that NE did not impair neutrophil recruitment to inflamed sites in the setting of lung infection as previously reported (16).

Extracellular NE activity increases over time in the setting of *P. aeruginosa* lung infection. Aliquots with equal volumes of cell-free BAL fluids corresponding to designated time points post-challenge were subjected to Western blotting using anti-mouse NE antibody. NE antigen was detected as early as 12h (Fig 1D). In parallel experiments, analysis of the same cell-free BAL samples by elastin zymography revealed the presence of active NE in

cell-free BAL fluids as early as 12h as well suggesting the presence of unopposed and active neutrophil-derived NE within the alveolar spaces (Fig. 1E). The presence of free active NE following challenge with bacteria, but not saline, was further confirmed by incubation of cell-free BAL fluids with synthetic NE specific substrate (data not shown). Of note, there was no evidence of active NE in BAL fluids derived from saline-treated or infected NE^{-/-} mice (data not shown, Fig. 1E, lanes 4, 6, 8).

Decreased levels of secreted TNF- α , MIP-2 and IL-6 in infected cell-free BALs in the absence of NE. Bacterial lung infection is accompanied with extracellular release of cytokines by local cells including resident alveolar macrophages, which participate to the recruitment and activation of neutrophils. Among the early cytokine responders are TNF- α , MIP-2 and IL-6. In a series of in vitro studies, NE has been shown to target various inflammatory mediators (15). Accordingly, we aimed to determine the effect of free active NE on TNF- α , MIP-2 and IL-6 in our pneumonia model. Equal volumes of infected WT and NE^{-/-} BAL fluids corresponding to 12h and 24h post-challenge were analyzed using a custom-designed mouse cytokine antibody microarray. Semi-quantitative analysis found marked decrease of protein levels of TNF- α , MIP-2, and IL-6 in NE^{-/-} BAL fluids compared to those of WT BAL fluids at 12h post-infection, which was maintained up to 24h post-infection (Fig. 2A and data not shown). Densitometry analyses further confirmed that the observed differences in cytokine levels between the genotypes were significant (Fig. 2B). While these levels potentially increase in response to *P. aeruginosa* infection at 4h, the emphasis of our studies was on the impact of free active NE on secreted TNF- α , MIP-2, and IL-6. Since we detected NE as early as 12h, we therefore focused on the time points 12h and/or 24h post-infection. Of note, the levels of TNF- α , MIP-2, and IL-6 were insignificant in saline-exposed WT and NE^{-/-} BAL fluids and their values were subtracted from those of infected BALs .

Next, we employed the multiplex approach to quantitatively compare the levels of TNF- α , MIP-2, and IL-6 in both WT and NE^{-/-} BAL fluids. Levels of TNF- α , MIP-2, and IL-6 were considerably different among genotypes in that protein concentrations of TNF- α , MIP-2, and IL-6 were significantly lower in NE^{-/-} BALs by comparison to WT BALs at 12h and 24h post-infection doubly confirming the microarray data (Fig. 3 and data not shown).

Decreased TNF- α , MIP-2 and IL-6 mRNA in infected lungs in the absence of NE. The decreased levels of TNF- α , MIP-2 and IL-6 could be attributed to protein degradation, which is highly unlikely or transcription modulation of these mediators involving NE. To test the latter hypothesis, mRNA expression of TNF- α , MIP-2 and IL-6 was examined. Whole lung tissues of WT and NE^{-/-} mice 12h and 24h were processed for RT-PCR analysis. As shown in figure 4, gel micrographs and densitometry histograms demonstrate that levels of mRNAs encoding for TNF- α , MIP-2, and IL-6 were lower in NE^{-/-} lungs compared to WT lungs at time point 12h, which were sustained up to 24h (Fig. 4A and B and data not shown). Of note, unchallenged or saline-instilled WT and NE^{-/-} mice had no detectable TNF- α , MIP-2 and IL-6 transcripts. Taken together, these data strongly suggest a role for NE in regulating the transcription of the mediators TNF- α , MIP-2 and IL-6.

Purified NE increases mRNA expression of TNF- α , MIP-2 and IL-6 in a macrophage cell line. In our studies, we focused on macrophages because these cells play a key role in initiating and/or amplifying lung inflammation and are known producers of TNF- α , MIP-2 and IL-6 following bacterial infection. To begin to understand the regulatory role of NE, the murine macrophage cell line J774 was used to investigate the effect of purified NE on mRNA expression of TNF- α , MIP-2 and IL-6. Expression of the mediators was determined by real time RT-PCR as described in materials and methods. We determined NE concentration and

incubation time post-NE treatment that generated maximal expression of the mediators. Dose response experiments found that exposure of the cells to NE at 500 nM for 1h followed by 4h incubation after removal of NE resulted in maximal mRNA expression of the mediators (Fig. 5A). Next, time post-NE treatment course experiments (0, 1, 2, 4, 12, and 24h) using NE at 500 nM revealed that maximal expression of the mediators was reached by 4h (data not shown). Overall, by comparison to untreated cells, exposure of J774 cells to NE at 500 nM for 1h followed by 4h culture post-NE treatment led to 2.2, 3, and 3.1 fold increase of TNF- α , MIP-2 and IL-6 mRNA transcripts respectively (Fig. 5B). As expected and in accordance with our reports, pre-incubation of NE with the physiologic inhibitor SLPI abrogated the enzyme's activity (data not shown and 17,20). These results suggest that active NE has a direct inducing effect on macrophages to express mRNA of TNF- α , MIP-2 and IL-6 *in vitro*.

NE-mediated upregulation of TNF- α , MIP-2 and IL-6 by macrophages involves in part TLR4. We next sought to determine whether NE mediates similar impact on primary macrophages. Macrophages were isolated from the peritoneum of WT mice. Using similar experimental conditions as above, incubation of the cells with NE resulted in significantly increased expression of TNF- α , MIP-2 and IL-6 by 2.2, 2.6, and 1.6 fold respectively by comparison to untreated cells (Fig. 6). Of note, Il-6 expression was less impressive in primary macrophages than cell line-derived macrophages suggesting perhaps differences in Il-6 related intracellular signalling events between the two types of cells.

In recent years, work by Devaney et al. reported the implication of Toll-like receptor 4 (TLR-4) in NE-induced expression of IL-8 in human bronchial epithelial cells *in vitro* (22). Given that macrophages also express TLR-4, we assessed the role of this receptor in NE-mediated expression of the mediators of interest. In parallel experiments with WT macrophages, we incubated NE with equivalent numbers of peritoneal macrophages isolated from mice with

non-fonctionnal TLR-4 (TLR4^{-/-}). Analyses of real time RT-PCR data showed a drastic decrease of TNF- α , MIP-2 and IL-6 mRNA expression by TLR4^{-/-} macrophages when compared to WT macrophages (Fig. 6). Thus, the findings indicate that NE-mediated upregulation of TNF- α , MIP-2 and IL-6 expression by macrophages involves in part TLR-4.

DISCUSSION

We have demonstrated that neutrophil elastase (NE) has the capacity to induce the expression of the pro-inflammatory cytokines TNF- α , MIP-2, and Il-6 both *in vivo* and *in vitro*. Using a model of bacterial pneumonia, NE-deficient mouse lungs showed considerably decreased protein levels of these mediators correlating with decreased expression of their corresponding transcripts. Exposure of macrophages (cell line or peritoneum-derived cells) to NE resulted in enhanced expression of TNF- α , MIP-2, and Il-6. Together, these findings provide compelling evidence that NE contributes to the regulation of inflammation at least in the setting of *P. aeruginosa* lung infection.

In normal states, the cell population of bronchoalveolar lavage (BAL) is composed most exclusively of alveolar macrophages. Following infection, PMNs migrate rapidly from the systemic circulation into infected tissues in response to various inflammatory stimuli including microbial-derived compounds and released mediators by activated alveolar macrophages. In accordance with previously published reports (4,5,16), we confirmed that the absence of NE impaired neither neutrophil migration in response to *P. aeruginosa* infection nor the cell density of alveolar macrophages, a cell type important for bacterial lung clearance (23). We also show that over time, neutrophil influx was accompanied with gradual increase of free active NE in mouse WT lungs. This finding is of considerable biological importance given the presence of various physiological NE inhibitors such as SLPI and Alpha-1 antitrypsin (24).

The local production of cytokines is a normal process of the host defense against bacterial infections. Alveolar macrophages play a prominent role in lung immunity by initiating

inflammatory and immune responses (25). In the setting of bacterial infection, these cells are capable of generating a variety of mediators that orchestrate an effective response against offending pathogens (26). TNF- α , MIP-2 and Il-6, known as an early-response cytokine, are produced by many types of cells, but alveolar macrophages are the potent sources of these mediators. There is a large body of evidence that these mediators are expressed following recognition of the invading pathogens by local cells particularly alveolar macrophages. And considerable evidence exists that these molecules play critical roles in mediating the lung neutrophilic inflammatory response to bacteria, a characteristic feature of our *P. aeruginosa* pneumonia model (27). In recent years, it has become increasingly clear that neutrophil serine proteases including NE have an important regulatory role in the local inflammatory response (15). However, the *in vivo* evidence and underlying mechanism(s) of such regulation are still obscure. In this work, we sought to determine whether NE regulates the expression of the cytokines, TNF- α , MIP-2 and Il-6 in *P. aeruginosa*-triggered lung inflammation. Analysis of protein and mRNA transcript of the mediators TNF- α , MIP-2, and Il-6 found increased levels in cell-free BALs and whole lung tissues derived from *P. aeruginosa*-infected WT mice by comparison to NE^{-/-} mice. These findings suggest a role for NE in the activation of local cells to produce these mediators. In support of our *in vivo* data, exposure of cell line- or peritoneum-derived macrophages to purified active NE, in the concentration range of 0.5 μ M, was sufficient to induce mRNA expression of TNF- α , MIP-2, and Il-6.

NE concentration used in these studies is below its physiological value, which has been reported to exceed the micromolar range (28,29). Of note, these estimates do not take into account possible evanescent quantum bursts of pericellular NE activity, local microenvironment, or the half life of NE in tissues, which might increase the effective concentration of the enzyme (30). Regarding the local microenvironment, because NE can be

inhibited by physiological pulmonary NE inhibitors at least in vitro it is likely that NE-mediated upregulation of TNF- α , MIP-2, and Il-6 expression is limited to situations of acute inflammation or infection in vivo. In fact, the increased expression of these mediators in vivo will be determined by the balance of active NE and NE inhibitors within specific microenvironment of the lung. However, consistent with our findings, lung injury or microbial challenge can be associated with the massive recruitment of neutrophils and extracellular release of free, active NE at inflamed milieu (31). As we have previously shown NE, both on the PMN cell surface and in the extracellular space, can accumulate in close spatial proximity to local cells at sites of active inflammation (18). All together, these observations suggest that unchecked NE could encounter and activate alveolar macrophages to mount a host defense response. A series of in vitro studies have also shown that NE is capable of activating various types of immune and non-immune cells testifying of the large cell spectrum that NE could target in vivo (32,33).

Various regulatory mechanisms of inflammation mediated by neutrophil serine proteases including NE, based mostly on in vitro studies, have been proposed. Proteolytic modifications of cytokines and/or chemokines consisting of N- or C-terminal processing increases or decreases these latter's biologic activities (e.g., recruitment/activation of leukocytes) (34). Other in vitro studies reported degradation of cytokines by these proteases (35). Proteolytic targeting of specific host cell receptors has been shown to modulate also the release of chemokines and cytokines (36). Whether these processes take place in inflammatory situations including bacterial infection await investigation. While the majority of these in vitro studies reported neutrophil serine protease-mediated changes of secreted cytokine proteins, only few studies have shown that NE induces Il-8 gene expression in human bronchial epithelial cell line (37). In a follow-up study, it was reported that active NE

targets/processes TLR-4 by as yet unknown mechanism leading to intracellular signaling events and upregulation of Il-8 by these cells (22). These findings led us to examine NE effect on the expression of TNF- α , MIP-2, and Il-6 by macrophages bearing non functional TLR-4 . In our hands, incubation of peritoneum-derived macrophages with NE resulted in significant increase of these mediators in WT cells by comparison to mutant cells. While these data reinforce the hypothesis of NE/TLR-4 interplay, the in vivo evidence of NE interaction with TLR-4 alone or complexed with CD14 and/or MD2 and the ensuing signaling events remain to be determined. Of interest, activated neutrophils release NE and two other related serine proteases cathepsin G and proteinase 3, which are all stored in neutrophil primary granules. The relative contribution of NE, PR3 and CG to upregulate inflammation particularly the expression of TNF- α , MIP-2 and Il-6 will be best determined once mice deficient in all three proteases are available. Efforts to generate triple NE/CG/PR3 mutant mice are underway.

As mentioned earlier, we have reported recently that NE-deficient mice are susceptible to *P. aeruginosa* lung infection. Collectively, the findings of this work clearly demonstrate that NE mediates the upregulation of inflammation triggered by *P. aeruginosa*. That NE deficiency is associated with decreased levels of the pro-inflammatory mediators TNF- α , MIP-2, and Il-6 adds new insights on the role of NE during the complex host-pathogen interaction : 1/NE has a dual role in host defense against *P. aeruginosa* lung infection. The enzyme is required for maximal neutrophil killing of bacteria but also upregulates extracellularly mediators that recruit and/or activate neutrophils; 2/ neutrophils migrate normally in response to *P. aeruginosa* despite decreased levels of these mediators suggesting the complex diversity of bacteria- or host-derived chemotactic molecules ; and 3/ extracellular NE has a beneficial role in host defense against bacterial infection. In conclusion, unopposed active NE is anticipated in any neutrophil-rich inflammatory milieu and our in vivo data point to a physiologic role for

the enzyme. As such, strategies aimed at inhibiting NE in tissue-destructive diseases (e.g., in the setting of *P. aeruginosa* lung infection) should take into account the enzyme's regulatory role of inflammation.

REFERENCES

1. Kolls JK, McCray PB Jr, Chan YR. 2008. Cytokine-mediated regulation of antimicrobial proteins. *Nat. Rev. Immunol.* 8:829-835.
2. Mizgerd, J. P. 2008. Acute lower respiratory tract infection. *N. Engl. J. Med.* 358:716-727.
3. Hampton, M. B., A. J. Kettle, and C. C. Winterbourn. 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92:3007-3017.
4. Ganz, T. 1999. Oxygen-independent microbicidal mechanisms of phagocytes. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 111:390-395.
5. Belaouaj, A., R. McCarthy, M. Baumann, Z. Gao, T. J. Ley, S. N. Abraham, and S. D. Shapiro. 1998. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat. Med.* 4:615-618.
6. Reeves, E. P., H. Lu, H. L. Jacobs, C. G. Messina, S. Bolsover, G. Gabella, E. O. Potma, A. Warley, J. Roes, and A. W. Segal. 2002. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* 416:291-297.
7. Bode, W., Meyer E Jr, and J. C. Powers. 1989. Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry* 28:1951-1963.
8. Liou, T. G. and E. J. Campbell. 1995. Nonisotropic enzyme--inhibitor interactions: a novel nonoxidative mechanism for quantum proteolysis by human neutrophils. *Biochemistry* 34:16171-16177.
9. Belaouaj, A., K. S. Kim, and S. D. Shapiro. 2000. Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science* 289:1185-1188.

10. Hirche T.O., R. Benabid, G. Deslee, S. Gangloff, S. Achilefu, M. Guenounou, F. Lebargy, R. E. Hancock, A. Belaaouaj. 2008. Neutrophil elastase mediates innate host protection against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Immunol.* 81:4945-4954.

11. Weinrauch, Y., D. Drujan, S. D. Shapiro, J. Weiss, and A. Zychlinsky. 2002. Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature* 417:91-94.

12. Lopez-boado, Y. S., M. Espinola, S. Bahr, and A. Belaaouaj. 2004. Neutrophil serine proteinases cleave bacterial flagellin, abrogating its host response-inducing activity. *Journal of Immunology* 172:509-515.

13. Birrer, P. 1995. Proteases and antiproteases in cystic fibrosis: pathogenetic considerations and therapeutic strategies. *Respiration* 62:25-28.

14. Moraes, T. J., C. W. Chow, and G. P. Downey. 2003. Proteases and lung injury. *Crit. Care Med.* 31:189-194.

15. Pham, C. T. 2006. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 6:541-550.

16. Hirche, T. O., J. J. Atkinson, S. Bahr, and A. Belaaouaj. 2004. Deficiency in neutrophil elastase does not impair neutrophil recruitment to inflamed sites. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30:576-584.

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

18. Belaouaj A., J. M. Shipley, D. K. Kobayashi, D. B. Zimonjic, N. Popescu, G. A. Silverman, and S. D. Shapiro. 1995. Human macrophage metalloelastase. Genomic organization, chromosomal location, gene linkage, and tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* 270:14568-14575.

19. Grandjean-Laquerriere A., O. Tabary, J. Jacquot, D. Richard, P. Frayssinet, M. Guenounou, D. Laurent-Maquin, P. Laquerriere, and S. Gangloff. 2007. Involvement of toll-like receptor 4 in the inflammatory reaction induced by hydroxyapatite particles. *Biomaterials.* 28:400-404.

20. Hirche, T. O., J. P. Gaut, J. W. Heinecke, and A. Belaouaj. 2005. Myeloperoxidase plays critical roles in killing *Klebsiella pneumoniae* and inactivating neutrophil elastase: Effects on host defense. *J. Immunol.* 174:1557-1565.

21. Velard F., D. Laurent-Maquin, C. Guillaume, S. Bouthors, E. Jallot, J. M. Nedelec, A. Belaouaj, and P. Laquerriere. 2009. Polymorphonuclear neutrophil response to hydroxyapatite particles, implication in acute inflammatory reaction. *Acta. Biomater.* Jan 21. [Epub ahead of print]

22. Devaney JM, Greene CM, Taggart CC, Carroll TP, O'Neill SJ, McElvaney NG. 2003. Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4. *FEBS Lett.* 544:129-132.

23. Kooguchi, K., S. Hashimoto, A. Kobayashi, Y. Kitamura, I. Kudoh, J. Wiener-Kronish, and T. Sawa. 1998. Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect. Immun.* 66:3164-3169.

24. Moreau T., K. Baranger, S. Dadé, S. Dallet-Choisy, N. Guyot, and M. L. Zani. 2008. Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family. *Biochimie*. 90:284-295.

25. Underhill D.M. and A. Ozinsky. 2002. Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.* 20:825-852.

26. Marriott H. M. and D. H. Dockrell. 2007. The role of the macrophage in lung disease mediated by bacteria. *Exp Lung Res.* 33:493-505.

27. Zhang P., W. R. Summer, G. J. Bagby, and S. Nelson. 2000. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev.* 173:39-51.

28. Delacourt, C., S. Herigault, C. Delclaux, A. Poncin, M. Levame, A. Harf, F. Saudubray, C. Lafuma. 2002. Protection against acute lung injury by intravenous or intratracheal pretreatment with EPI-HNE-4, a new potent neutrophil elastase inhibitor. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26:290-297.

29. Guyot N., M. W. Butler, P. McNally, S. Weldon, C. M. Greene, R. L. Levine, S. J. O'Neill, C. C. Taggart, and N. G. McElvaney. 2008. Elafin, an elastase-specific inhibitor, is cleaved by its cognate enzyme neutrophil elastase in sputum from individuals with cystic fibrosis. *J. Biol. Chem.* 283:32377-32385.

30. Liou, T. G. and E. J. Campbell. 1995. Nonisotropic enzyme--inhibitor interactions: a novel nonoxidative mechanism for quantum proteolysis by human neutrophils. *Biochemistry* 34:16171-16177.
31. Moraes T. J., J. H. Zurawska, and G. P. Downey. 2006. Neutrophil granule contents in the pathogenesis of lung injury. *Curr. Opin. Hematol.* 13:21-27.
32. Roghanian A, Drost EM, MacNee W, Howie SE, Sallenave JM. 2006. Inflammatory lung secretions inhibit dendritic cell maturation and function via neutrophil elastase. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 174:1189-1198.
33. Uehara A, K. Muramoto, H. Takada, and S. Sugawara. 2003. Neutrophil serine proteinases activate human nonepithelial cells to produce inflammatory cytokines through protease-activated receptor 2. *J Immunol.* 170:5690-5696.
34. Nufer O., M. Corbett, and A. Walz. 1999. Amino-terminal processing of chemokine ENA-78 regulates biological activity. *Biochemistry.* 38:636-642.
35. Scuderi P., P. A. Nez, M. L. Duerr, B. J. Wong, and C. M. Valdez. 1991. Cathepsin-G and leukocyte elastase inactivate human tumor necrosis factor and lymphotoxin. *Cell Immunol.* 135:299-313.
36. Sambrano G. R., W. Huang, T. Faruqi, S. Mahrus, C. Craik, and S. R. Coughlin. 2000. Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets. *J. Biol. Chem.* 275:6819-6823.

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

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Lung histology, neutrophil influx, and NE activity following lung infection with *P. aeruginosa*. **A**, Representative H&E stained NE^{-/-} lung section at 24h post- *P. aeruginosa* lung infection showed patchy neutrophil infiltrates, which was similar in both WT and NE^{-/-} genotypes (arrowheads, X40 and X200). **B**, Total leukocyte counts in BAL fluids of NE^{-/-} and WT mice in response to *P. aeruginosa* intranasal challenge at time points 4, 12, and 24h. **C**, Representative cytospin micrograph from infected NE^{-/-} BAL fluids at 24h (X200). Cytospin analyses revealed similar predominance of cellular infiltrates by neutrophils in both infected NE^{-/-} and WT mouse lungs. **D**, Equal volumes of cell-free WT and NE^{-/-} BALs (10 µl) were resolved by SDS-PAGE and processed for Western blotting using a specific anti-mouse NE antibody. Note that NE was detected as early as 12h post-infection. **E**, Active NE appears as a transparent lysis band at ~30 kD in purified NE (lane 1). Active NE is detected as a single lysis band in cell-free BAL fluids of *P. aeruginosa*-challenged WT mice at 12h and 24h (lanes 5 and 7). No lysis band (thus, no activity) was detected in cell-free BAL fluids from NE^{-/-} mice (lanes 6 and 8). Molecular mass standards are shown on the left.

Figure 2. Examination of secreted levels of TNF- α , MIP-2, and IL-6 in infected cell-free BALs. **A**, Representative spot blots of cytokine antibody array analysis of infected WT and NE^{-/-} cell-free BALs showing decreased protein levels of secreted TNF- α , MIP-2, and IL-6 in the absence of NE. **B**, Densitometric analysis confirms decreased levels of the mediators of interest. Shown are representative histograms of individual mediators. Data represent the mean \pm SD of four values. Of note, level values of the mediators corresponding to saline-BAL fluids were subtracted from those of infected BALs. Experiments were repeated three times (*, p<0.05 for differences between genotypes).

Figure 3. Quantitative analysis of secreted levels of TNF- α , MIP-2, and IL-6 in infected cell-free BALs. Concentrations of protein levels of secreted TNF- α , MIP-2, and IL-6 were estimated in WT and NE^{-/-} cell-free BALs derived from infected mice in figure 2 using multiplex bead-based immunoassay. Shown are representative histograms of individual mediators. Data represent the mean \pm SD of four values. Of note, level values of the mediators corresponding to saline-BAL fluids were subtracted from those of infected BALs. Experiments were repeated three times (*, $p < 0.05$ for differences between genotypes).

Figure 4. Expression of TNF- α , MIP-2, and IL-6 mRNA in infected WT and NE^{-/-} lungs. A, Expression of TNF- α , MIP-2, and IL-6 in whole lung tissues at 12h post-infection was analyzed by RT-PCR using 28S as an internal control. Amplified products were resolved on agarose gel and stained with ethidium bromide. The size of the amplified products for TNF- α , MIP-2, IL-6, and 28 S were 110, 248, 268, and 212 bp respectively. Shown are representative gel images of amplified cDNAs corresponding to individual mediators. Note the decreased expression level of the mediators in infected NE^{-/-} lung tissues by comparison to infected WT lung tissues. Densitometric analysis confirms decreased levels of the mediators of interest. Of note, no amplified products of the mediators in saline-WT or NE^{-/-} whole lungs were detected. Shown are representative histograms of individual mediators. Data represent the mean \pm SD of four values. Experiments were repeated three times (*, $p < 0.05$ for differences between genotypes).

Figure 5. Effect of NE on the expression of TNF- α , MIP-2, and IL-6 mRNA by J774 macrophages. A, Confluent cell line-derived J774 macrophages were left untreated or treated with varying concentrations of purified NE (0, 100, 300 or 500 nM) for 1h and cultured for 4h

as described in Material and Methods. Cells were collected and processed for RNA extraction and real time RT-PCR using primers specific for each cytokine and GAPDH as an internal control. Shown are representative histograms corresponding to TNF- α expression data only. Note TNF- α reached maximal expression with NE at 500 nM. **B**, Shown are representative histograms corresponding to data of maximal expression of TNF- α , MIP-2, and IL-6 with NE at 500 nM. Data represent the mean \pm SD of three values. Experiments were repeated three times (*, $p < 0.05$ for differences between NE-treated and untreated samples). Results are expressed as fold increase of expression of the mediators in NE-treated cells by comparison to untreated cells.

Figure 6. Effect of NE on the expression of TNF- α , MIP-2, and IL-6 mRNA by murine primary WT and TLR-/- macrophages. Confluent peritoneal macrophages derived from C3H/HeJ (TLR4^{-/-}) and control C3H/HeN mice were left untreated or treated with purified NE at 500 nM for 1h and cultured for 4h as described in Material and Methods. Cells were collected and processed for RNA extraction and real time RT-PCR as described above. Shown are representative histograms corresponding to data of expression of TNF- α , MIP-2, and IL-6 with NE at 500 nM. Data represent the mean \pm SD of three values. Note while both cell types express TNF- α , MIP-2, and IL-6, TLR-/- macrophages exhibit significantly decreased expression of the mediators. Experiments were repeated three times (*, $p < 0.05$ for differences between NE-treated and untreated samples). Results are expressed as fold increase of expression of the mediators in NE-treated cells by comparison to untreated cells.

Figure 1

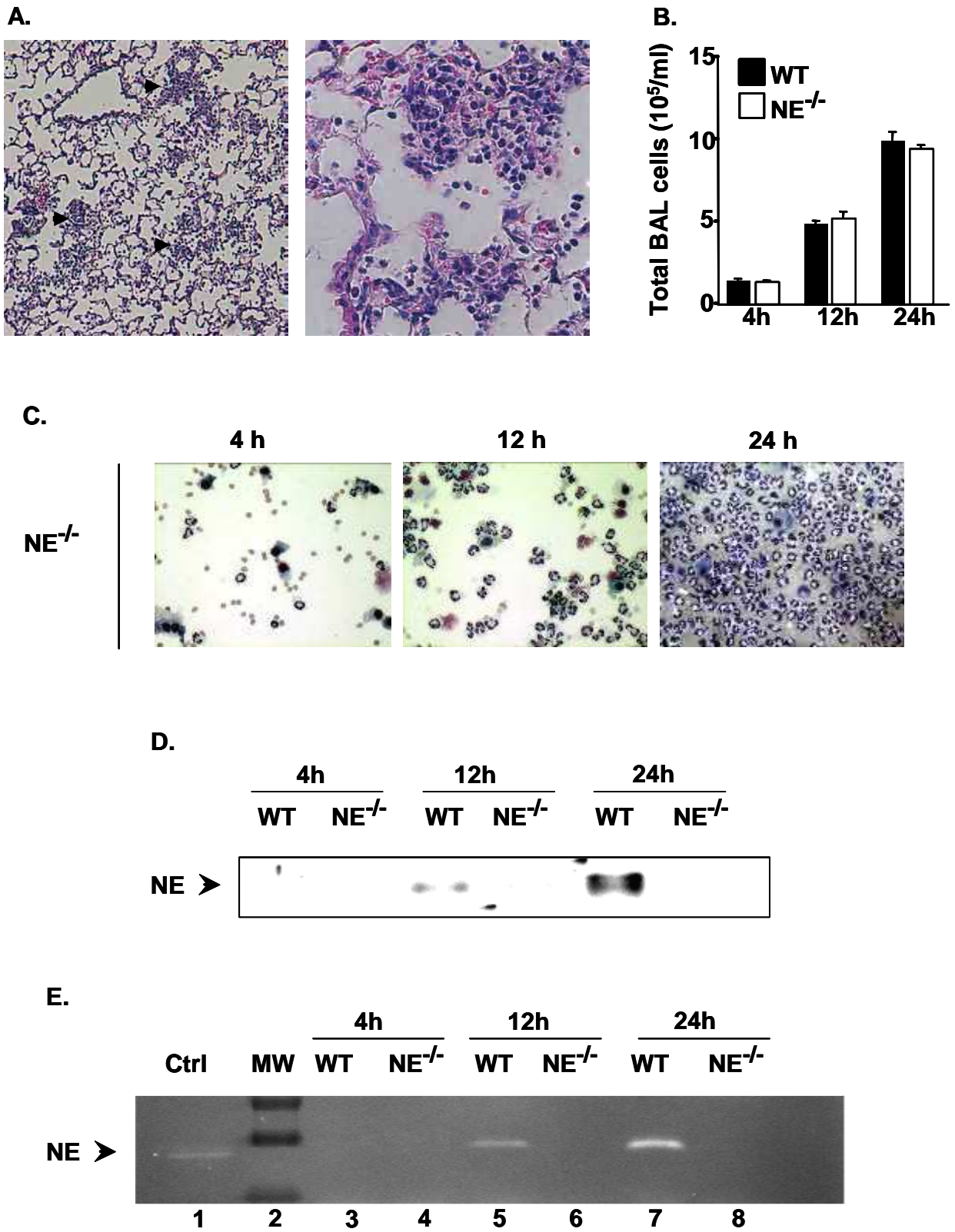
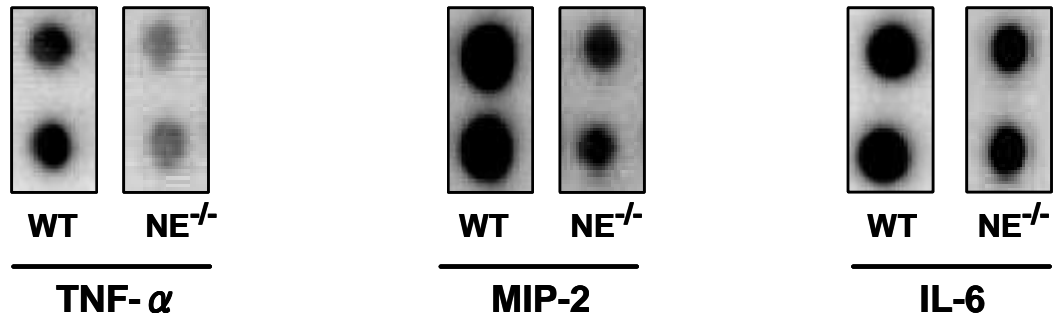


Figure 2

A.



B.

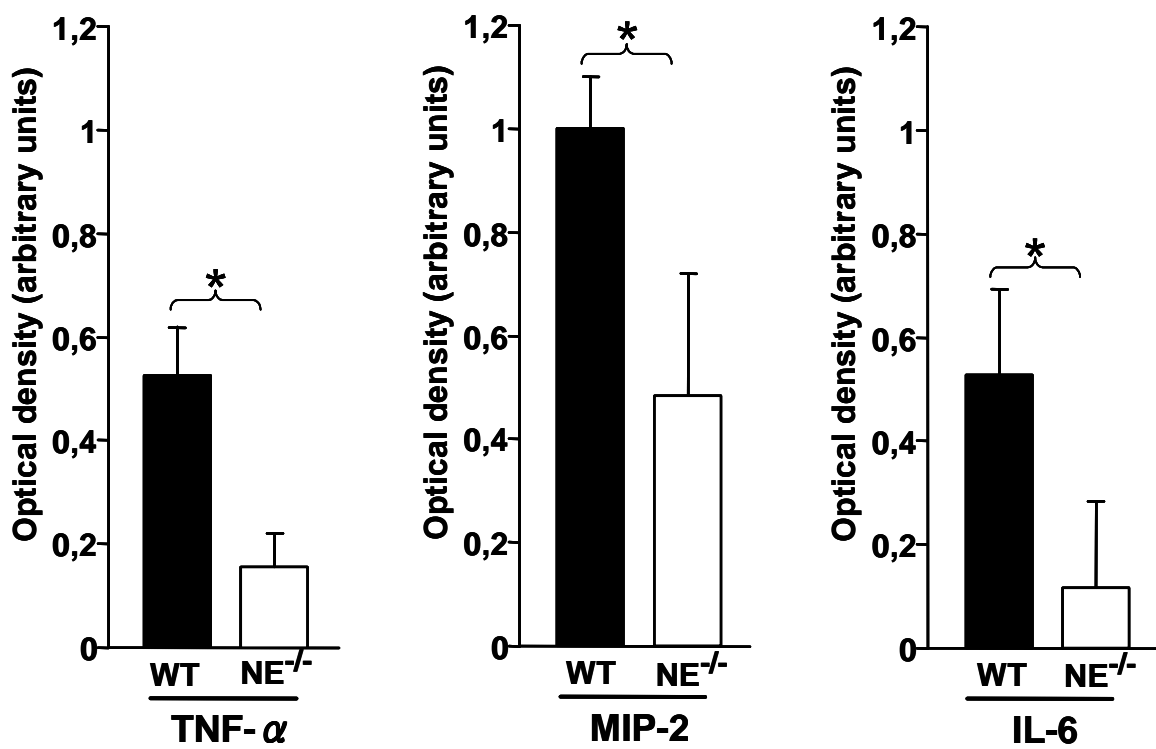


Figure 3

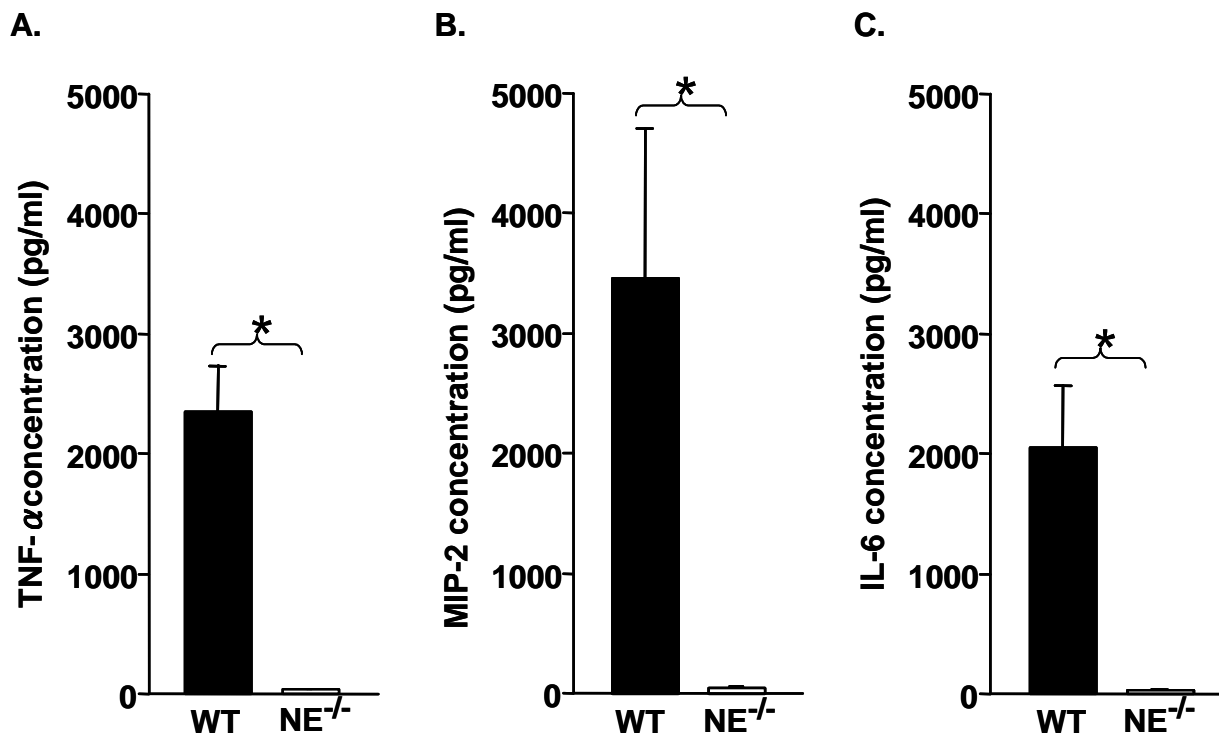


Figure 4

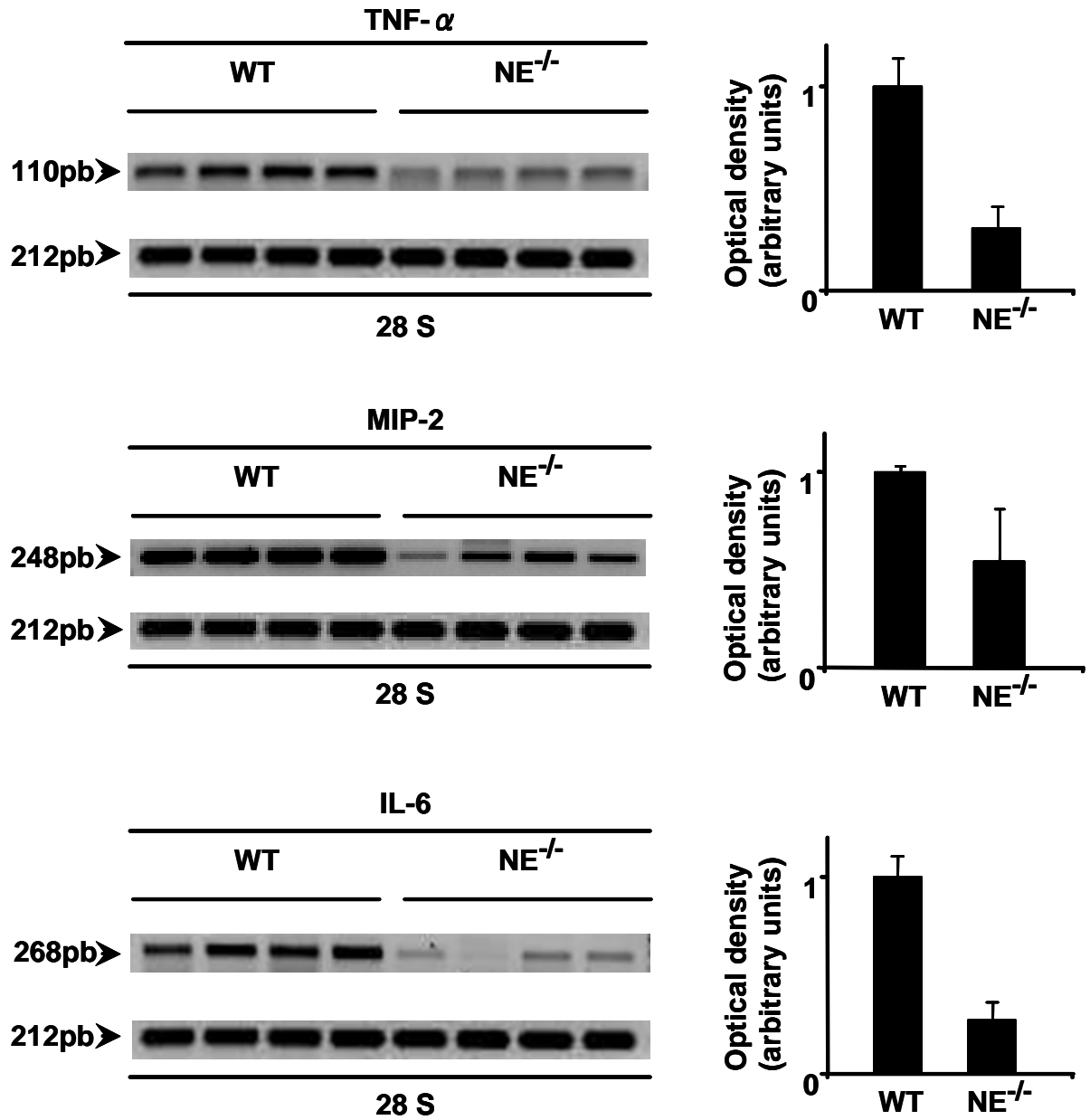


Figure 5

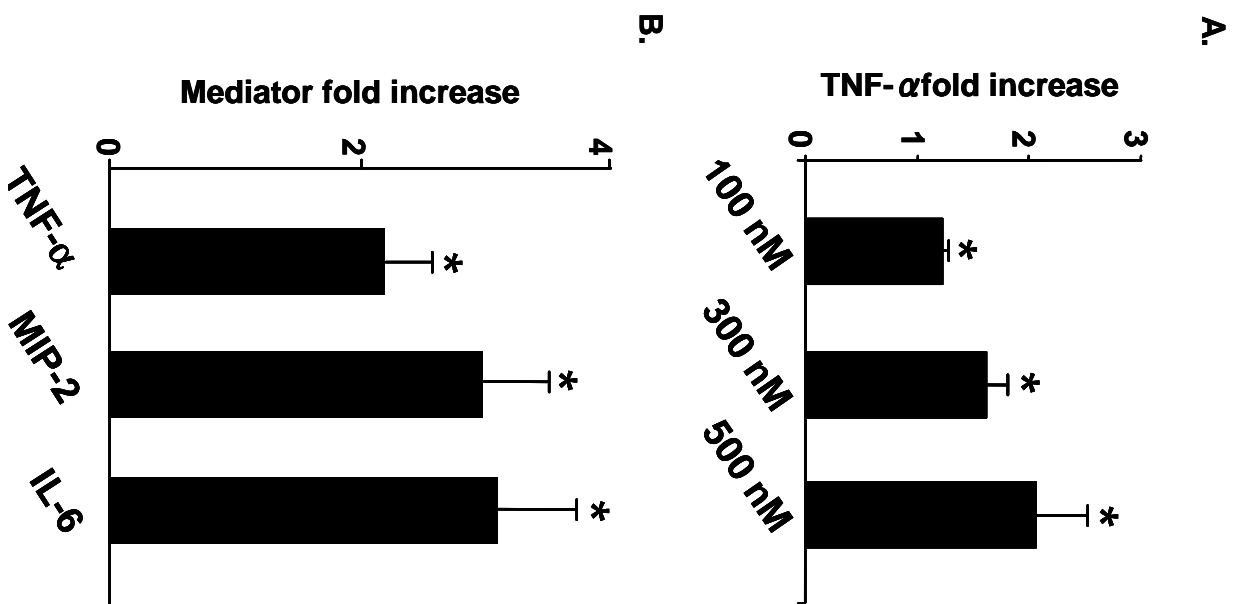
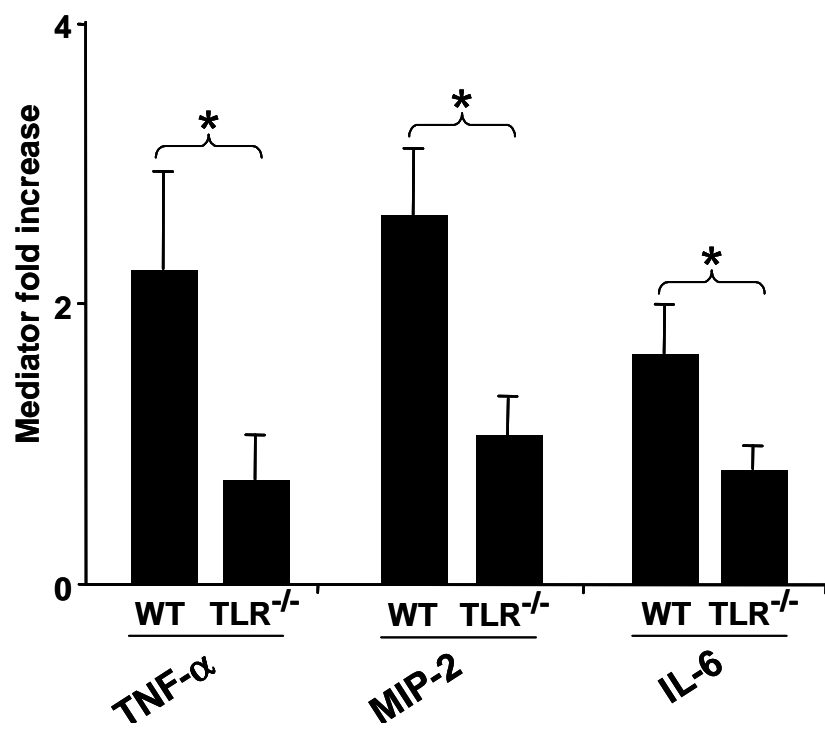


Figure 6



Cette étude nous a permis de démontrer que :

- (1) suite à une infection intra-nasale par *P. aeruginosa*, de deux groupes de souris WT et NE^{-/-}, le recrutement des neutrophiles au site infectieux n'est pas altéré à 4, 12 et 24 heures post-infection.
- (2) la concentration des médiateurs inflammatoires au niveau des lavages broncho-alvéolaires de souris NE^{-/-} est diminuée par rapport à celle des souris WT. Le taux protéique des médiateurs inflammatoires TNF- α , MIP-2 et l'Il-6 est faible en l'absence de la NE à 12 heures après l'infection.
- (3) La NE régule les médiateurs inflammatoires TNF- α , MIP-2 et l'Il-6 à un niveau transcriptionnel.
- (4) La NE stimule la sécrétion des médiateurs TNF- α , MIP-2 et l'Il-6 dans une lignée de macrophage alvéolaire murine ainsi que chez des macrophages murins *ex vivo*.
- (5) l'induction de l'expression des cytokines par la NE implique au moins le récepteur cellulaire TLR4.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats suggère le rôle de la NE dans la modulation de réponse inflammatoire suite à une infection pulmonaire par *P. aeruginosa*. La NE stimule l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , MIP-2 et l'Il-6 au moins par l'intermédiaire du récepteur cellulaire TLR4.

*Discussion et
Perspectives*

Dans les infections pulmonaires à *P. aeruginosa*, la NE a été reconnue depuis longtemps comme une enzyme à effet délétère pour l'épithélium respiratoire. Cette sérine protéase possède un large spectre d'action et est capable de dégrader la matrice extracellulaire et causer des lésions pulmonaires.

Les principaux objectifs de ce travail de thèse étaient d'étudier le rôle « bénéfique » de la NE dans les infections pulmonaires à *P. aeruginosa*.

La première étude a concerné l'analyse du rôle de la NE dans les infections pulmonaires à *P. aeruginosa*. Nous avons montré pour la première fois que la NE possède un rôle protecteur contre l'infection à *P. aeruginosa*.

En utilisant un modèle clinique de pneumonie aigüe, nous avons démontré que les souris déficientes en NE (NE^{-/-}) sont plus susceptibles à l'infection par *P. aeruginosa* que les souris WT. Ensuite, en analysant la capacité des souris à éliminer *P. aeruginosa*, nous avons montré que les souris NE^{-/-} sont moins capables d'éliminer le pathogène que les souris WT. Ainsi, NE joue un rôle important dans la protection de l'hôte contre l'infection à *P. aeruginosa*.

En réponse à une infection à *P. aeruginosa*, la réaction inflammatoire aigüe est caractérisée par la migration des neutrophiles depuis les capillaires pulmonaires jusqu'à l'espace alvéolaire. Contrairement à d'autres études qui ont proposé le rôle de la NE dans la migration des neutrophiles, l'absence de l'enzyme n'altère pas le recrutement des neutrophiles au site de l'infection dans notre modèle murin de pneumonie aigüe. Ces résultats sont en accord avec de précédents travaux démontrant la non implication de la NE dans la migration des neutrophiles dans le cas de différents modèles d'infections induits par différents pathogènes (Belaouaj A *et al.*, 1998 ; Tkalcevic J *et al.*, 2000 ; Hirche T.O *et al.*, 2004). Parallèlement, la densité des macrophages alvéolaires, cellules immunitaires importantes à la clairance bactérienne au niveau des poumons, n'était pas affecté par la déficience en NE.

La fonction majeure des neutrophiles au niveau du site inflammatoire est la clairance des bactéries envahissantes. La comparaison des fonctions antibactériennes des neutrophiles WT et NE^{-/-} contre *P. aeruginosa* indique que les fonctions de phagocytose et d'explosion respiratoire n'ont pas été altérées chez les neutrophiles NE^{-/-}. Cependant, et bien que le nombre de bactéries viables diminue en la présence des neutrophiles WT et NE^{-/-}, l'activité bactéricide des neutrophiles NE^{-/-} est diminuée par rapport à celle des neutrophiles WT. Ce défaut dans la fonction bactéricide a été attribué à l'absence de la NE.

Dans le but de déterminer le mécanisme par lequel NE cible *P. aeruginosa*, nous avons observé qu'une exposition directe du pathogène à la NE résulte en une perte de sa morphologie avec une désorganisation membranaire et une augmentation de la perméabilité indiquant que l'enzyme cible des protéines essentielles à la conservation de l'intégrité de *P. aeruginosa*. Les protéines de la membrane externe de *P. aeruginosa* comprennent une porine : OprF qui représente 15% de la fraction protéique de *P. aeruginosa* ($2 * 10^5$ copies / bactérie) ce qui en fait un composant majeur de ce pathogène (Woodruff W.A *et al.*, 1986). OprF est associée au peptidoglycane sous-jacent et contribue à la stabilisation de la membrane externe. La dégradation d'OprF par la NE peut ainsi expliquer l'altération de l'intégrité du pathogène observée et la mort consécutive de *P. aeruginosa*.

Un travail récent a montré que *P. aeruginosa* se lie à l'IFN γ de l'hôte à travers OprF résultant en l'activation du système quorum-sensing et l'activation de l'expression des gènes de virulence (Wu L *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent donc qu'en dégradant OprF, la NE diminue la capacité de *P. aeruginosa* à activer le système immunitaire de l'hôte et à avoir une pathogénie efficace. Il a été démontré également que la NE cible la flagelline, un composant majeure du flagelle, et empêche sa transcription par un mécanisme non défini jusqu'à ce jour (Lopez-Boado Y.S *et al.*, 2004 ; Sonawane A *et al.*, 2006). L'ensemble de ces résultats mettent en évidence la capacité de la NE à tuer *P. aeruginosa* et à anéantir sa virulence. La dégradation d'OprF par la NE peut également accentuer la mort de *P. aeruginosa* à travers d'autres mécanismes. En effet, les produits de dégradation d'OprF peuvent être toxiques à *P. aeruginosa*. Aussi, en dégradant OprF la NE peut diffuser à l'intérieur de *P. aeruginosa* et dégrader des protéines importantes à la survie de la bactérie. Enfin, la dégradation d'OprF médiée par la NE altère la perméabilité membranaire du pathogène, ouvrant ainsi la voie à d'autres molécules antibactériennes du neutrophile à altérer le pathogène et à causer sa mort. Une étude de la structure primaire d'OprF a révélée plusieurs sites de clivage de la NE dont quelque uns localisées à la surface de la bactérie (Rawling E.G *et al.*, 1995). Nous avons confirmé cette dégradation d'OprF par la NE en incubant des neutrophiles avec la membrane externe de *P. aeruginosa* ou en incubant les bactéries vivantes avec la NE. L'ensemble des ces résultats suggèrent que la NE, libre ou associée au neutrophile, est capable de dégrader OprF. Il faut noter aussi, que les concentrations de la NE utilisées dans ce travail sont inférieures aux concentrations physiologiques de l'enzyme qui dépassent le taux du millimolaire.

La NE est capable également de cibler OprF à l'intérieur du phagolysosome où la bactérie est piégée. En effet, il a été montré que la NE entoure la bactérie ingérée à l'intérieur

du phagolysosome et dégrade ses facteurs de virulence (Weinrauch Y.d *et al.*, 2002). Parallèlement, la dégradation d'OprF par la NE extracellulaire du neutrophile, libérée par dégranulation, peut se produire à l'extérieur du phagolysosome. La NE extracellulaire s'associe avec des structures chromatiniennes et forme les NETs qui sont capables de capturer et cibler les pathogènes et/ou leurs facteurs de virulence (Brinkmann U.V *et al.*, 2004). Sachant que la phagocytose est la fonction antibactérienne majeure des neutrophiles, l'importance relative de la NE extracellulaire, seule ou associée aux NETs dans la défense de l'hôte contre *P. aeruginosa* reste à déterminer. Il faut noter également que la dégradation extracellulaire d'OprF *in vivo* est déterminée par la balance entre la NE active et ses inhibiteurs physiologiques.

En se basant sur les résultats de l'inhibition de la NE, il semblerait que la PR3 contribue à la dégradation d'OprF étant donné que le SLPI n'inhibe pas cette sérine protéase et que la CG ne dégrade pas OprF. Une étude récente a montré que la CG n'est pas nécessaire à la protection de l'hôte contre *P. aeruginosa* dans un modèle d'infection endobronchique à *Pseudomonas* (Sedor J *et al.*, 2007). Toutefois la contribution de la PR3 dans l'élimination du pathogène et la protection de l'hôte reste indéfinie. La génération de souris déficientes en les trois sérine-protéase est donc nécessaire et nous informera quant à la contribution relative de chaque sérine protéase dans la protection de l'hôte contre *P. aeruginosa*.

Nos résultats démontrant la dégradation d'OprF par la NE dans le cas d'isolats *P. aeruginosa* issus de patients atteints de pneumonies sont d'une importance majeure et renforcent l'hypothèse que la NE est importante à l'activité bactéricide des neutrophiles en ciblant les protéines de la membrane externe des bactéries Gram négatif. Ainsi OprF peut représenter une cible dans l'établissement d'une stratégie thérapeutique contre *P. aeruginosa*. Cependant et sachant que *P. aeruginosa* change son phénotype afin de s'adapter dans les différents environnements, il est nécessaire de mener des études supplémentaires sur des souches de *P. aeruginosa* issus de diverses infections dans le but de déterminer s'il existe une corrélation entre la susceptibilité de ces souches à la NE et l'expression d'OprF.

Les résultats de cette première étude nous ont permis de mettre en évidence et pour la première fois le rôle protecteur de la NE dans un modèle murin d'infection pulmonaire à *P. aeruginosa*.

La seconde étude a concerné l'analyse de l'implication de la NE dans la modulation de l'expression des cytokines pro-inflammatoires. Nous avons montré que la NE possède la capacité d'augmenter l'expression des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , MIP-2 et l'IL-6

in vivo et *in vitro*. En utilisant un modèle de pneumonie aigüe à *P. aeruginosa*, l'analyse des poumons des souris NE^{-/-} a révélé une diminution de l'expression de ces médiateurs, à un niveau protéique ainsi qu'à un niveau transcriptionnel, par rapport aux souris WT. Egalement, le traitement d'une lignée de macrophages murins et de macrophages *ex vivo* par la NE résulte en l'augmentation de la transcription de TNF- α , MIP-2 et l'IL-6. Ces résultats suggèrent que la NE contribue à la régulation de l'inflammation dans les infections pulmonaires à *P. aeruginosa*.

La population cellulaire des LBA, recueillis après infection, se compose majoritairement de neutrophiles ayant migré depuis la circulation systémique jusqu'au site infectieux en réponse à divers stimuli inflammatoires (tels que les composants bactériens et les médiateurs sécrétés par les macrophages alvéolaires activés). Nous avons confirmé que le déficit en NE n'altère pas la densité cellulaire des macrophages alvéolaires ainsi que la migration des neutrophiles au site inflammatoire en réponse à une infection pulmonaire par *P. aeruginosa*. On a également montré que l'activité enzymatique de la NE active au niveau des poumons des souris WT augmente graduellement en fonction du temps (4, 12 et 24 heures).

La production locale de cytokines est un mécanisme de défense innée en réponse à une infection bactérienne. Les macrophages alvéolaires jouent un rôle important dans la défense immunitaire pulmonaire en initiant la réponse inflammatoire (Underhill D.M *et al.*, 2002). Dans le cas d'infection bactérienne, ces cellules sécrètent une variété de médiateurs nécessaires à une réponse inflammatoire efficace contre les pathogènes bactériens (Marriott H.M *et al.*, 2007). TNF- α , MIP-2 et l'IL-6 sont produits par divers types cellulaires et en particulier par les macrophages alvéolaires, et sont sécrétés suite à la reconnaissance des pathogènes. Ces cytokines pro-inflammatoires jouent un rôle important dans la réponse neutrophilique aux bactéries. Durant ces dernières années, des études se sont intéressées à l'implication des sérine-protéase dans la régulation de la réponse inflammatoire locale mais les mécanismes de régulation des cytokines par les NSP, notamment *in vivo*, n'ont pas été élucidés à ce jour.

L'analyse des médiateurs TNF- α , MIP-2 et l'IL-6 suite à une infection pulmonaire à *P. aeruginosa* a montré une diminution de leur expression au niveau protéique (dans les LBA des souris NE^{-/-} par rapport aux souris WT) et que cette diminution se situe à un niveau transcriptionnel. Ces résultats suggèrent le rôle de la NE dans l'activation des cellules immunitaires à produire TNF- α , MIP-2 et l'IL-6.

Nous avons confirmé ces résultats *in vivo* par des études *in vitro* utilisant une lignée de macrophage murine et des macrophages *ex vivo*. L'exposition de ces cellules à 0.5 μM de NE induit la transcription des ARNm de TNF- α , MIP-2 et l'IL-6.

La concentration de la NE utilisée dans cette étude est inférieure aux concentrations physiologiques. Cette enzyme peut être inhibée dans le microenvironnement pulmonaire par des inhibiteurs physiologiques et son effet de régulation positive de TNF- α , MIP-2 et l'IL-6 semble être limité à un modèle d'infection aiguë. En effet, l'augmentation de l'expression de ces médiateurs *in vivo* est déterminée par une balance entre la NE active et ses inhibiteurs présent dans le poumon.

Les lésions pulmonaires observées en cas d'infections bactériennes peuvent être associées au recrutement massif des neutrophiles au site inflammatoire et à la dégranulation de la NE dans le milieu extracellulaire. La NE présente à la surface des neutrophiles dans ce milieu inflammatoire peut activer un large spectre de cellules y compris les macrophages alvéolaires et d'autres types de cellules immunitaires et non immunitaires.

Plusieurs mécanismes de régulation de l'inflammation par les NSP se basant sur des études *in vitro* ont été proposés. Les premiers concernent les modifications protéolytiques des chimiokines et des cytokines au niveau N-terminal et/ou C-terminal qui peuvent induire soit une augmentation soit une diminution de leurs activités biologiques (Nufer O. *et al.*, 1999). D'autres études *in vitro* ont montré que les protéases sont capables de dégrader les cytokines (Scuderi P *et al.*, 1991). Enfin, un ciblage protéolytique des récepteurs de la cellule hôte peut moduler la sécrétion des chimiokines et cytokines (Sambrano G.R *et al.*, 2000).

Notons que la majorité de ces études réalisées *in vitro* ont montré que les NSP modulent l'expression des chimiokines et cytokines secrétées. Une étude a également montré que la NE induit l'expression génique de l'IL-8 chez une lignée de cellules épithéliales bronchiques (Walsh D.E *et al.*, 2001). La suite de ce travail a démontré que la NE cible le récepteur TLR4, par un mécanisme non élucidé à ce jour, et conduit à une augmentation de l'expression de l'IL-8 chez cette même lignée cellulaire humaine (Devaney J.M *et al.*, 2003).

En se basant sur ce dernier résultat nous avons voulu étudier l'effet de la NE sur l'expression de TNF- α , MIP-2 et l'IL-6 chez une lignée de macrophage *ex vivo* présentant un récepteur TLR4 non fonctionnel. L'incubation de macrophages WT et TLR4^{-/-}, issus de lavage intra-péritonéal, avec la NE résulte en une augmentation significative de la transcription des médiateurs TNF- α , MIP-2 et l'IL-6 chez les cellules WT par rapport aux cellules TLR4^{-/-}. Ces résultats viennent appuyer l'hypothèse de la présence d'une interaction entre la sérine protéase NE et le récepteur TLR4. Toutefois, une étude *in vivo* permettant de

prouver cette interaction est désormais nécessaire et doit mettre en évidence la signalisation correspondante.

Sachant que les neutrophiles activés libèrent par dégranulation la NE et deux autres sérine-protéase la CG et la PR3, la contribution relative de ces trois enzymes à la régulation de l'inflammation et plus précisément à la régulation de l'expression des médiateurs TNF- α , MIP-2 et l'IL-6 reste à déterminer.

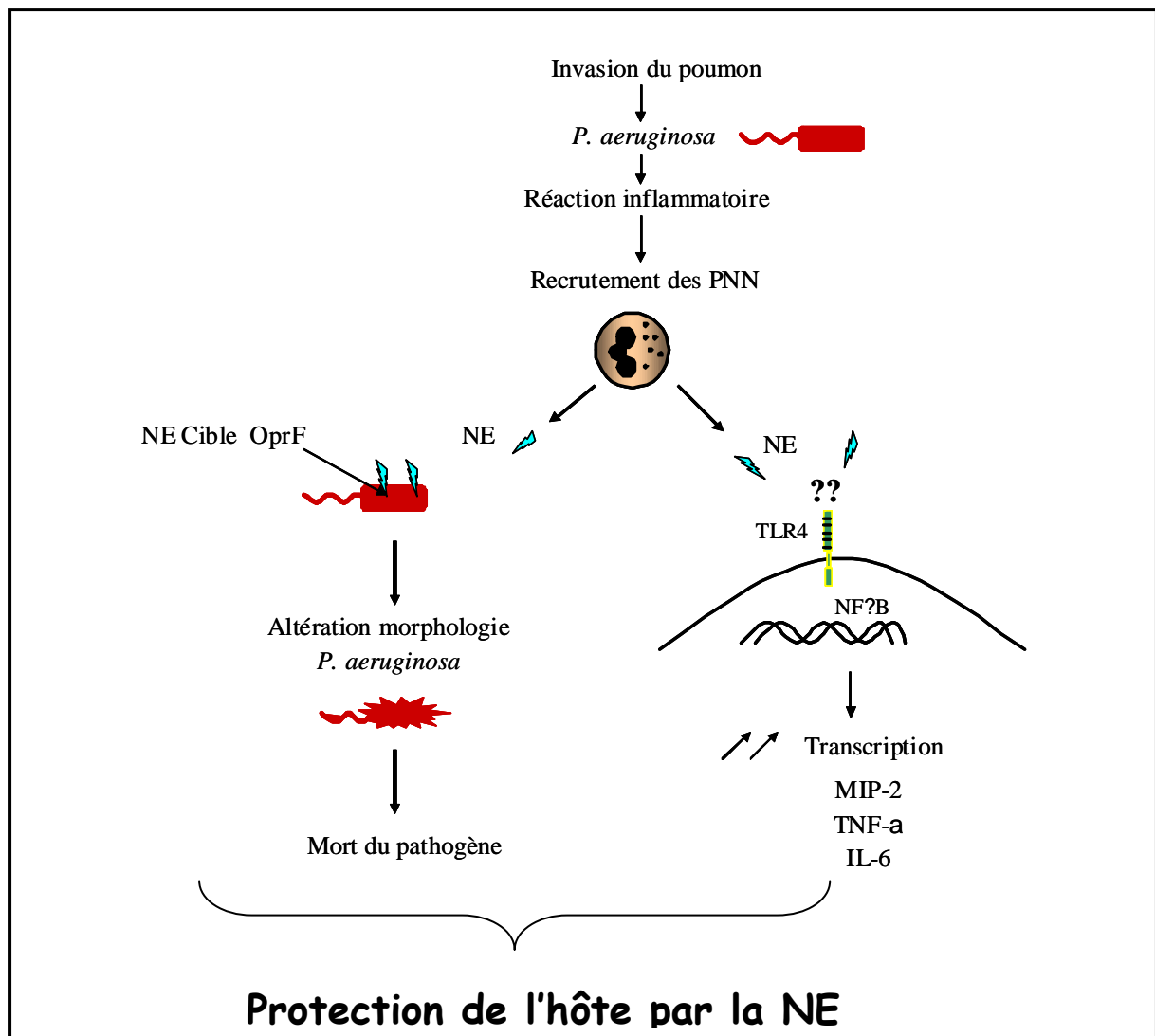
Les résultats de cette deuxième étude montrent clairement que la déficience en NE est associée avec une diminution des taux des cytokines pro-inflammatoires TNF- α , MIP-2 et l'IL-6. Ils permettent d'élargir nos connaissances quant au rôle de cette sérine protéase dans les interactions hôte-pathogène.

En conclusion, la NE possède un double rôle dans la défense de l'hôte contre l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* ; l'enzyme est nécessaire pour une élimination efficace du pathogène par les neutrophiles et possède un rôle bénéfique dans la défense de l'hôte contre les infections bactériennes. La NE est également impliquée dans la sur-expression des médiateurs nécessaires au recrutement et/ou activation des neutrophiles au site inflammatoire. Mais et malgré la diminution des taux des médiateurs TNF- α , MIP-2 et l'IL-6, les neutrophiles migrent normalement au site infectieux ce qui suggère la complexité du mécanisme responsable de leur tactisme.

La NE est donc nécessaire à une réponse inflammatoire efficace contre une infection pulmonaire à *P. aeruginosa*.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de mettre en évidence que (schéma ci-dessous) :

1. la NE dégrade OprF dans le cas d'infections pulmonaires aiguës à *P. aeruginosa*.
2. la NE régule la réponse inflammatoire en réponse à *P. aeruginosa* en induisant la sécrétion de cytokines inflammatoires TNF- α , MIP-2 et l'IL-6.
3. le récepteur TLR4 serait impliqué dans la surexpression des médiateurs TNF- α , MIP-2 et l'IL-6 dans les infections à *P. aeruginosa*.



Afin de compléter nos résultats, il serait intéressant de :

- (i) Etudier l'effet de la NE sur différentes souches cliniques de *P. aeruginosa* et notamment des souches issues de patients mucoviscidosiques afin de savoir si la sérine protéase cible OprF.
- (ii) Analyser son rôle dans un modèle d'infection endobronchiale mimant la mucoviscidose.
- (iii) Réaliser des co-cultures de cellules épithéliales et de *P. aeruginosa* et les traiter par la NE afin d'évaluer la balance entre l'effet protecteur et l'effet destructeur des différentes concentrations utilisées de l'enzyme *in vitro*.
- (iv) Etudier la contribution relative des sérine-protéase PR3 et CG dans la défense antibactérienne de l'hôte : génération de souris triples déficientes en NE, CG et PR3.

- (v) Concernant la deuxième partie de ce travail, il serait intéressant de focaliser les prochaines études à la compréhension du mécanisme d'action de la NE sur le récepteur TLR4 et d'étudier les voies de signalisation impliquées dans la régulation de TNF- α , MIP-2 et l'IL-6.

Références
Bibliographiques

Références Bibliographiques

Aarbiou, J., M. Ertmann, W. S. van, N. P. van, D. Rook, K. F. Rabe, S. V. Litvinov, J. H. van Krieken, W. I. de Boer, and P. S. Hiemstra. 2002. Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation in vitro. *J. Leukoc. Biol.* 72:167-174.

Abe, H., K. Okajima, H. Okabe, K. Takatsuki, and B. R. Binder. 1994. Granulocyte proteases and hydrogen peroxide synergistically inactivate thrombomodulin of endothelial cells in vitro. *J. Lab Clin. Med.* 123:874-881.

Adamo, R., S. Sokol, G. Soong, M. I. Gomez, and A. Prince. 2004. Pseudomonas aeruginosa flagella activate airway epithelial cells through asialoGM1 and toll-like receptor 2 as well as toll-like receptor 5. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30:627-634.

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

Agerberth, B., J. Charo, J. Werr, B. Olsson, F. Idali, L. Lindbom, R. Kiessling, H. Jornvall, H. Wigzell, and G. H. Gudmundsson. 2000. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 96:3086-3093.

Akira, S. and K. Takeda. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nat. Rev. Immunol.* 4:499-511.

Akira, S. and K. Takeda. 2004. Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. *C. R. Biol.* 327:581-589.

Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124:783-801.

Akira, S. 2006. TLR signaling. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 311:1-16.

Albelda, S. M., C. W. Smith, and P. A. Ward. 1994. Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J.* 8:504-512.

Allen, D. H. and P. B. Tracy. 1995. Human coagulation factor V is activated to the functional cofactor by elastase and cathepsin G expressed at the monocyte surface. *J. Biol. Chem.* 270:1408-1415.

Armstrong, D. A., J. A. Major, A. Chudyk, and T. A. Hamilton. 2004. Neutrophil chemoattractant genes KC and MIP-2 are expressed in different cell populations at sites of surgical injury. *J. Leukoc. Biol.* 75:641-648.

Avidano, M. A., C. S. Cotter, S. P. Stringer, and G. S. Schultz. 1998. Analysis of protease activity in human otitis media. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 119:346-351.

Azghani, A. O., S. Idell, M. Bains, and R. E. Hancock. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein F is an adhesin in bacterial binding to lung epithelial cells in culture. *Microb. Pathog.* 33:109-114.

Babior, B. M. 1984. Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood* 64:959-966.

Babior, B. M. 1999. NADPH oxidase: an update. *Blood* 93:1464-1476.

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

Bals, R. and J. M. Wilson. 2003. Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol. Life Sci.* 60:711-720.

Bank, U., B. Kupper, and S. Ansorge. 2000. Inactivation of interleukin-6 by neutrophil proteases at sites of inflammation. Protective effects of soluble IL-6 receptor chains. *Adv. Exp. Med. Biol.* 477:431-437.

Barclay, N. G., J. C. Spurrell, T. F. Bruno, D. G. Storey, D. E. Woods, and C. H. Mody. 1999. *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S stimulates murine lymphocyte proliferation in vitro. *Infect. Immun.* 67:4613-4619.

Bazzoni, F. and B. Beutler. 1996. The tumor necrosis factor ligand and receptor families. *N. Engl. J. Med.* 334:1717-1725.

Beamer, L. J., S. F. Carroll, and D. Eisenberg. 1997. Crystal structure of human BPI and two bound phospholipids at 2.4 angstrom resolution. *Science* 276:1861-1864.

Beaufort, N., D. Leduc, J. C. Rousselle, A. Namane, M. Chignard, and D. Pidard. 2004. Plasmin cleaves the juxtamembrane domain and releases truncated species of the urokinase receptor (CD87) from human bronchial epithelial cells. *FEBS Lett.* 574:89-94.

Belaouaj, A., B. C. Walsh, N. A. Jenkins, N. G. Copeland, and S. D. Shapiro. 1997. Characterization of the mouse neutrophil elastase gene and localization to chromosome 10. *Mamm. Genome* 8:5-8.

Belaouaj, A., R. McCarthy, M. Baumann, Z. Gao, T. J. Ley, S. N. Abraham, and S. D. Shapiro. 1998. Mice lacking neutrophil elastase reveal impaired host defense against gram negative bacterial sepsis. *Nat. Med.* 4:615-618.

Belaouaj, A., K. S. Kim, and S. D. Shapiro. 2000. Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by neutrophil elastase. *Science* 289:1185-1188.

Belaouaj, A. 2002. Neutrophil elastase-mediated killing of bacteria: lessons from targeted mutagenesis. *Microbes. Infect.* 4:1259-1264.

Benelli, R., G. Lorusso, A. Albin, and D. M. Noonan. 2006. Cytokines and chemokines as regulators of angiogenesis in health and disease. *Curr. Pharm. Des* 12:3101-3115.

Benhamou, D. 1996. [Combined spinal and epidural anesthesia or epidural anesthesia in obstetrics?]. *Cah. Anesthesiol.* 44:157-158.

Benson, K. F., F. Q. Li, R. E. Person, D. Albani, Z. Duan, J. Wechsler, K. Meade-White, K. Williams, G. M. Acland, G. Niemeyer, C. D. Lothrop, and M. Horwitz. 2003.

Mutations associated with neutropenia in dogs and humans disrupt intracellular transport of neutrophil elastase. *Nat. Genet.* 35:90-96.

Bertrand, C. A. and R. A. Frizzell. 2003. The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 285:C1-18.

Bode, W., Meyer E Jr, and J. C. Powers. 1989. Human leukocyte and porcine pancreatic elastase: X-ray crystal structures, mechanism, substrate specificity, and mechanism-based inhibitors. *Biochemistry* 28:1951-1963.

Bodey, G. P., R. Bolivar, V. Fainstein, and L. Jadeja. 1983. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infect. Dis.* 5:279-313.

Braun, P., C. Ockhuijsen, E. Eppens, M. Koster, W. Bitter, and J. Tommassen. 2001. Maturation of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. Formation of the disulfide bonds. *J. Biol. Chem.* 276:26030-26035.

Brinkmann, V., U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, and A. Zychlinsky. 2004. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303:1532-1535.

Brinkmann, V. and A. Zychlinsky. 2007. Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. *Nat. Rev. Microbiol.* 5:577-582.

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

Carden, D., F. Xiao, C. Moak, B. H. Willis, S. Robinson-Jackson, and S. Alexander. 1998. Neutrophil elastase promotes lung microvascular injury and proteolysis of endothelial cadherins. *Am. J. Physiol* 275:H385-H392.

Caughey, G. H., T. H. Schaumberg, E. H. Zerweck, J. H. Butterfield, R. D. Hanson, G. A. Silverman, and T. J. Ley. 1993. The human mast cell chymase gene (CMA1): mapping to the cathepsin G/granzyme gene cluster and lineage-restricted expression. *Genomics* 15:614-620.

Champagne, B., P. Tremblay, A. Cantin, and P. Y. St. 1998. Proteolytic cleavage of ICAM-1 by human neutrophil elastase. *J. Immunol.* 161:6398-6405.

Chapon-Herve, V., M. Akrim, A. Latifi, P. Williams, A. Lazdunski, and M. Bally. 1997. Regulation of the xcp secretion pathway by multiple quorum-sensing modulons in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 24:1169-1178.

Chen, Z. J. 2005. Ubiquitin signalling in the NF-kappaB pathway. *Nat. Cell Biol.* 7:758-765.

Chertov, O., H. Ueda, L. L. Xu, K. Tani, W. J. Murphy, J. M. Wang, O. M. Howard, T. J. Sayers, and J. J. Oppenheim. 1997. Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils. *J. Exp. Med.* 186:739-747.

Christensen, T. G., G. C. Blanchard, G. Nolley, and J. A. Hayes. 1981. Ultrastructural localization of endogenous peroxidase in the lower respiratory tract of the guinea pig. *Cell Tissue Res.* 214:407-415.

Chun, J. and A. Prince. 2006. Activation of Ca²⁺-dependent signaling by TLR2. *J. Immunol.* 177:1330-1337.

Clark, R. A. 1999. Activation of the neutrophil respiratory burst oxidase. *J. Infect. Dis.* 179 Suppl 2:S309-S317.

Cole, A. M., H. I. Liao, O. Stuchlik, J. Tilan, J. Pohl, and T. Ganz. 2002. Cationic polypeptides are required for antibacterial activity of human airway fluid. *J. Immunol.* 169:6985-6991.

Comolli, J. C., L. L. Waite, K. E. Mostov, and J. N. Engel. 1999. Pili binding to asialo-GM1 on epithelial cells can mediate cytotoxicity or bacterial internalization by *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 67:3207-3214.

Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322.

Costerton, J. W. 1999. Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* 11:217-221.

Craig, L., M. E. Pique, and J. A. Tainer. 2004. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:363-378.

Crouch, E., K. Hartshorn, and I. Ofek. 2000. Collectins and pulmonary innate immunity. *Immunol. Rev.* 173:52-65.

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

Cryz, S. J., Jr., T. L. Pitt, E. Furer, and R. Germanier. 1984. Role of lipopolysaccharide in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 44:508-513.

Devaney, J. M., C. M. Greene, C. C. Taggart, T. P. Carroll, S. J. O'Neill, and N. G. McElvaney. 2003. Neutrophil elastase up-regulates interleukin-8 via toll-like receptor 4. *FEBS Lett.* 544:129-132.

Dinarello, C. A. 2000. Proinflammatory cytokines. *Chest* 118:503-508.

Dobo, J. and P. G. Gettins. 2004. alpha1-Proteinase inhibitor forms initial non-covalent and final covalent complexes with elastase analogously to other serpin-proteinase pairs, suggesting a common mechanism of inhibition. *J. Biol. Chem.* 279:9264-9269.

Donnelly, S. C., I. MacGregor, A. Zamani, M. W. Gordon, C. E. Robertson, D. J. Steedman, K. Little, and C. Haslett. 1995. Plasma elastase levels and the development of the adult respiratory distress syndrome. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 151:1428-1433.

Dubouix, A., C. Campanac, J. Fauvel, M. F. Simon, J. P. Salles, C. Roques, H. Chap, and N. Marty. 2003. Bactericidal properties of group IIa secreted phospholipase A(2) against *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *J. Med. Microbiol.* 52:1039-1045.

Dulon, S., C. Cande, N. W. Bunnett, M. D. Hollenberg, M. Chignard, and D. Pidard. 2003. Proteinase-activated receptor-2 and human lung epithelial cells: disarming by neutrophil serine proteinases. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 28:339-346.

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

Engel, L. S., J. M. Hill, J. M. Moreau, L. C. Green, J. A. Hobden, and R. J. O'Callaghan. 1998. *Pseudomonas aeruginosa* protease IV produces corneal damage and contributes to bacterial virulence. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 39:662-665.

Engel, L. S., J. M. Hill, A. R. Caballero, L. C. Green, and R. J. O'Callaghan. 1998. Protease IV, a unique extracellular protease and virulence factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 273:16792-16797.

Estrellas, P. S., Jr., L. G. Alionte, and J. A. Hobden. 2000. A *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a contact lens-induced acute red eye (CLARE) is protease-deficient. *Curr. Eye Res.* 20:157-165.

Evans, J. H. and M. J. Sanderson. 1999. Intracellular calcium oscillations regulate ciliary beat frequency of airway epithelial cells. *Cell Calcium* 26:103-110.

Faure, K., R. Leberre, and B. Guery. 2006. [*Pseudomonas aeruginosa* and Surfactant-associated Proteins A and D]. *Med. Mal Infect.* 36:63-71.

Faurschou, M. and N. Borregaard. 2003. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes. Infect.* 5:1317-1327.

Feldman, M., R. Bryan, S. Rajan, L. Scheffler, S. Brunnert, H. Tang, and A. Prince. 1998. Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect. Immun.* 66:43-51.

- Feuillet, V., S. Medjane, I. Mondor, O. Demaria, P. P. Pagni, J. E. Galan, R. A. Flavell, and L. Alexopoulou. 2006.** Involvement of Toll-like receptor 5 in the recognition of flagellated bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:12487-12492.
- Finck-Barbancon, V., J. Goranson, L. Zhu, T. Sawa, J. P. Wiener-Kronish, S. M. Fleiszig, C. Wu, L. Mende-Mueller, and D. W. Frank. 1997.** ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury. *Mol. Microbiol.* 25:547-557.
- Finnen, R. L., N. L. Martin, R. J. Siehnel, W. A. Woodruff, M. Rosok, and R. E. Hancock. 1992.** Analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane protein OprF by use of truncated OprF derivatives and monoclonal antibodies. *J. Bacteriol.* 174:4977-4985.
- Fitch, P. M., A. Roghanian, S. E. Howie, and J. M. Sallenave. 2006.** Human neutrophil elastase inhibitors in innate and adaptive immunity. *Biochem. Soc. Trans.* 34:279-282.
- Fuqua, W. C., S. C. Winans, and E. P. Greenberg. 1994.** Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176:269-275.
- Furie, M. B. and G. J. Randolph. 1995.** Chemokines and tissue injury. *Am. J. Pathol.* 146:1287-1301.
- Gangloff, S. C., N. Hijiya, A. Haziot and SM Goyert. 1999.** Lipopolysaccharide structure influences the macrophage response via CD14-independent and CD14-dependent pathways. *Clin.Infect.Dis.*, 28:491-496.
- Ganz, T. 1999.** Oxygen-independent microbicidal mechanisms of phagocytes. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 111:390-395.

Garwicz, D., A. Lennartsson, S. E. Jacobsen, U. Gullberg, and A. Lindmark. 2005.

Biosynthetic profiles of neutrophil serine proteases in a human bone marrow-derived cellular myeloid differentiation model. *Haematologica* 90:38-44.

Gauldie, J., C. Richards, D. Harnish, P. Lansdorp, and H. Baumann. 1987. Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84:7251-7255.

Gauthier, F., U. Fryksmark, K. Ohlsson, and J. G. Bieth. 1982. Kinetics of the inhibition of leukocyte elastase by the bronchial inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta* 700:178-183.

Gerson, C., J. Sabater, M. Scuri, A. Torbati, R. Coffey, J. W. Abraham, I. Lauredo, R. Forteza, A. Wanner, M. Salathe, W. M. Abraham, and G. E. Conner. 2000. The lactoperoxidase system functions in bacterial clearance of airways. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22:665-671.

Gilgenkrantz, S. 2005. [Small treatise on art of warfare... from Shigella]. *Med. Sci. (Paris)* 21:443-444.

Ginzberg, H. H., V. Cherapanov, Q. Dong, A. Cantin, C. A. McCulloch, P. T. Shannon, and G. P. Downey. 2001. Neutrophil-mediated epithelial injury during transmigration: role of elastase. *Am. J. Physiol Gastrointest. Liver Physiol* 281:G705-G717.

Gomez, M. I. and A. Prince. 2008. Airway epithelial cell signaling in response to bacterial pathogens. *Pediatr. Pulmonol.* 43:11-19.

Gotoh, N., H. Wakebe, E. Yoshihara, T. Nakae, and T. Nishino. 1989. Role of protein F in maintaining structural integrity of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane. *J. Bacteriol.* 171:983-990.

Grandjean-Laquerriere, A., S. C. Gangloff, R. Le Naour, C. Trentesaux, W. Hornebeck and Guenounou M. 2002. Relative contribution of NF-kappaB and AP-1 in the modulation by curcumin and pyrrolidine dithiocarbamate of the UVB-induced cytokine expression by keratinocytes. *Cytokine*, 18:168-177.

Gullberg, U., A. Lindmark, G. Lindgren, A. M. Persson, E. Nilsson, and I. Olsson. 1995. Carboxyl-terminal prodomain-deleted human leukocyte elastase and cathepsin G are efficiently targeted to granules and enzymatically activated in the rat basophilic/mast cell line RBL. *J. Biol. Chem.* 270:12912-12918.

Guo, R. F. and P. A. Ward. 2002. Mediators and regulation of neutrophil accumulation in inflammatory responses in lung: insights from the IgG immune complex model. *Free Radic. Biol. Med.* 33:303-310.

Gupta, S. K., R. S. Berk, S. Masinick, and L. D. Hazlett. 1994. Pili and lipopolysaccharide of *Pseudomonas aeruginosa* bind to the glycolipid asialo GM1. *Infect. Immun.* 62:4572-4579.

Hagiwara, K., T. Kikuchi, Y. Endo, Huqun, K. Usui, M. Takahashi, N. Shibata, T. Kusakabe, H. Xin, S. Hoshi, M. Miki, N. Inooka, Y. Tokue, and T. Nukiwa. 2003. Mouse SWAM1 and SWAM2 are antibacterial proteins composed of a single whey acidic protein motif. *J. Immunol.* 170:1973-1979.

Hampton, M. B., A. J. Kettle, and C. C. Winterbourn. 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 92:3007-3017.

Hatchette, T. F., R. Gupta, and T. J. Marrie. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* community-acquired pneumonia in previously healthy adults: case report and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 31:1349-1356.

Havemann, K. and M. Gramse. 1984. Physiology and pathophysiology of neutral proteinases of human granulocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 167:1-20.

Heck, L. W., P. G. Alarcon, R. M. Kulhavy, K. Morihara, M. W. Russell, and J. F. Mestecky. 1990. Degradation of IgA proteins by *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J. Immunol.* 144:2253-2257.

Heusel, J. W., E. M. Scarpati, N. A. Jenkins, D. J. Gilbert, N. G. Copeland, S. D. Shapiro, and T. J. Ley. 1993. Molecular cloning, chromosomal location, and tissue-specific expression of the murine cathepsin G gene. *Blood* 81:1614-1623.

Hiemstra, P. S., R. J. Maassen, J. Stolk, R. Heinzl-Wieland, G. J. Steffens, and J. H. Dijkman. 1996. Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect. Immun.* 64:4520-4524.

Hiemstra, P. S., R. J. Maassen, J. Stolk, R. Heinzl-Wieland, G. J. Steffens, and J. H. Dijkman. 1996. Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infect. Immun.* 64:4520-4524.

Hirayama, T. and I. Kato. 1984. Mode of cytotoxic action of pseudomonal leukocidin on phosphatidylinositol metabolism and activation of lysosomal enzyme in rabbit leukocytes. *Infect. Immun.* 43:21-27.

Hirche, T. O., J. J. Atkinson, S. Bahr, and A. Belaaouaj. 2004. Deficiency in neutrophil elastase does not impair neutrophil recruitment to inflamed sites. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 30:576-584.

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

Hirche, T. O., R. Benabid, G. Deslee, S. Gangloff, S. Achilefu, M. Guenounou, F. Lebagry, R. E. Hancock, and A. Belaaouaj. 2008. Neutrophil elastase mediates innate host protection against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Immunol.* 181:4945-4954.

Ho, P. L., W. M. Tang, K. S. Lo, and K. Y. Yuen. 1998. Necrotizing fasciitis due to *Vibrio alginolyticus* following an injury inflicted by a stingray. *Scand. J. Infect. Dis.* 30:192-193.

Hoebe, K., E. M. Janssen, S. O. Kim, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, J. Han, and B. Beutler. 2003. Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat. Immunol.* 4:1223-1229.

Hong, Y. Q. and B. Ghebrehwet. 1992. Effect of *Pseudomonas aeruginosa* elastase and alkaline protease on serum complement and isolated components C1q and C3. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 62:133-138.

- Horwitz, M., K. F. Benson, Z. Duan, F. Q. Li, and R. E. Person. 2004.** Hereditary neutropenia: dogs explain human neutrophil elastase mutations. *Trends Mol. Med.* 10:163-170.
- Hynes, R. O. 1992.** Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 69:11-25.
- Jarrell, K. F. and M. J. McBride. 2008.** The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat. Rev. Microbiol.* 6:466-476.
- Jiang, Z., P. Georgel, X. Du, L. Shamel, S. Sovath, S. Mudd, M. Huber, C. Kalis, S. Keck, C. Galanos, M. Freudenberg, and B. Beutler. 2005.** CD14 is required for MyD88-independent LPS signaling. *Nat. Immunol.* 6:565-570.
- Kaplanski, G., V. Marin, F. Montero-Julian, A. Mantovani, and C. Farnarier. 2003.** IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol.* 24:25-29.
- Kawabata, K., A. R. Moore, and D. A. Willoughby. 1996.** Impaired activity of protease inhibitors towards neutrophil elastase bound to human articular cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* 55:248-252.
- Kawabata, K., T. Hagio, and S. Matsuoka. 2002.** The role of neutrophil elastase in acute lung injury. *Eur. J. Pharmacol.* 451:1-10.
- Kawai, T., M. Seki, K. Hiromatsu, J. W. Eastcott, G. F. Watts, M. Sugai, D. J. Smith, S. A. Porcelli, and M. A. Taubman. 1999.** Selective diapedesis of Th1 cells induced by endothelial cell RANTES. *J. Immunol.* 163:3269-3278.
- Kawai, T. and S. Akira. 2006.** TLR signaling. *Cell Death. Differ.* 13:816-825.
- Kessler, E. and M. Safrin. 1988.** Synthesis, processing, and transport of *Pseudomonas aeruginosa* elastase. *J. Bacteriol.* 170:5241-5247.

Kessler, E., M. Safrin, W. R. Abrams, J. Rosenbloom, and D. E. Ohman. 1997. Inhibitors and specificity of *Pseudomonas aeruginosa* LasA. *J. Biol. Chem.* 272:9884-9889.

Khan, T. Z., J. S. Wagener, T. Bost, J. Martinez, F. J. Accurso, and D. W. Riches. 1995. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 151:1075-1082.

Kido, H., Y. Beppu, Y. Imamura, Y. Chen, M. Murakami, K. Oba, and T. Towatari. 1999. The human mucus protease inhibitor and its mutants are novel defensive compounds against infection with influenza A and Sendai viruses. *Biopolymers* 51:79-86.

Kipnis, E., T. Sawa, and J. Wiener-Kronish. 2006. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med. Mal Infect.* 36:78-91.

Kohler, T., L. K. Curty, F. Barja, D. C. van, and J. C. Pechere. 2000. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J. Bacteriol.* 182:5990-5996.

Konstan, M. W., P. W. Cheng, and T. F. Boat. 1982. A comparative study of lysozyme and its secretion by tracheal epithelium. *Exp. Lung Res.* 3:175-181.

Korkmaz, B., S. Attucci, M. L. Jourdan, L. Juliano, and F. Gauthier. 2005. Inhibition of neutrophil elastase by alpha1-protease inhibitor at the surface of human polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol.* 175:3329-3338.

Korkmaz, B., T. Moreau, and F. Gauthier. 2008. Neutrophil elastase, proteinase 3 and cathepsin G: physicochemical properties, activity and physiopathological functions. *Biochimie* 90:227-242.

Krall, R., G. Schmidt, K. Aktories, and J. T. Barbieri. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* ExoT is a Rho GTPase-activating protein. *Infect. Immun.* 68:6066-6068.

Kramps, J. A., H. M. Morrison, D. Burnett, J. H. Dijkman, and R. A. Stockley. 1987. Determination of elastase inhibitory activity of alpha 1-proteinase inhibitor and bronchial

antileukoprotease: different results using insoluble elastin or synthetic low molecular weight substrates. *Scand. J. Clin. Lab Invest* 47:405-410.

Kumagai, Y., O. Takeuchi, and S. Akira. 2008. Pathogen recognition by innate receptors. *J. Infect. Chemother.* 14:86-92.

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

Lawson, P. R. and K. B. Reid. 2000. The roles of surfactant proteins A and D in innate immunity. *Immunol. Rev.* 173:66-78.

Le-Barillec, K., M. Si-Tahar, V. Balloy, and M. Chignard. 1999. Proteolysis of monocyte CD14 by human leukocyte elastase inhibits lipopolysaccharide-mediated cell activation. *J. Clin. Invest* 103:1039-1046.

Le, B. R., K. Faure, S. Nguyen, M. Pierre, F. Ader, and B. Guery. 2006. [Quorum sensing: a new clinical target for *Pseudomonas aeruginosa*?]. *Med. Mal Infect.* 36:349-357.

Lee, K. Y., S. C. Ho, H. C. Lin, S. M. Lin, C. Y. Liu, C. D. Huang, C. H. Wang, K. F. Chung, and H. P. Kuo. 2006. Neutrophil-derived elastase induces TGF-beta1 secretion in human airway smooth muscle via NF-kappaB pathway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 35:407-414.

Lenander-Lumikari, M. 1992. Inhibition of *Candida albicans* by the Peroxidase/SCN-/H₂O₂ system. *Oral Microbiol. Immunol.* 7:315-320.

Levesque, J. P., Y. Takamatsu, S. K. Nilsson, D. N. Haylock, and P. J. Simmons. 2001. Vascular cell adhesion molecule-1 (CD106) is cleaved by neutrophil proteases in the bone marrow following hematopoietic progenitor cell mobilization by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 98:1289-1297.

Levy, O., C. E. Ooi, P. Elsbach, M. E. Doerfler, R. I. Lehrer, and J. Weiss. 1995. Antibacterial proteins of granulocytes differ in interaction with endotoxin. Comparison of

bactericidal/permeability-increasing protein, p15s, and defensins. *J. Immunol.* 154:5403-5410.

Lim, J. K., W. Lu, O. Hartley, and A. L. DeVico. 2006. N-terminal proteolytic processing by cathepsin G converts RANTES/CCL5 and related analogs into a truncated 4-68 variant. *J. Leukoc. Biol.* 80:1395-1404.

Liou, T. G. and E. J. Campbell. 1995. Nonisotropic enzyme--inhibitor interactions: a novel nonoxidative mechanism for quantum proteolysis by human neutrophils. *Biochemistry* 34:16171-16177.

Liou, T. G. and E. J. Campbell. 1996. Quantum proteolysis resulting from release of single granules by human neutrophils: a novel, nonoxidative mechanism of extracellular proteolytic activity. *J. Immunol.* 157:2624-2631.

Lopez-Boado, Y. S., M. Espinola, S. Bahr, and A. Belaouaj. 2004. Neutrophil serine proteinases cleave bacterial flagellin, abrogating its host response-inducing activity. *J. Immunol.* 172:509-515.

Louis, D., J. Bernillon, and J. M. Wallach. 1998. Specificity of *Pseudomonas aeruginosa* serralyisin revisited, using biologically active peptides as substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 1387:378-386.

Luscinskas, F. W., G. S. Kansas, H. Ding, P. Pizcueta, B. E. Schleiffenbaum, T. F. Tedder, and M. A. Gimbrone, Jr. 1994. Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4-activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, beta 1-integrins, and beta 2-integrins. *J. Cell Biol.* 125:1417-1427.

Lynn, W. A. and D. T. Golenbock. 1992. Lipopolysaccharide antagonists. *Immunol. Today* 13:271-276.

Malik, A. B. and S. K. Lo. 1996. Vascular endothelial adhesion molecules and tissue inflammation. *Pharmacol. Rev.* 48:213-229.

- Marriott, H. M. and D. H. Dockrell. 2007.** The role of the macrophage in lung disease mediated by bacteria. *Exp. Lung Res.* 33:493-505.
- Martin, D. W., M. J. Schurr, M. H. Mudd, J. R. Govan, B. W. Holloway, and V. Deretic. 1993.** Mechanism of conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* infecting cystic fibrosis patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:8377-8381.
- Martin, E., T. Ganz, and R. I. Lehrer. 1995.** Defensins and other endogenous peptide antibiotics of vertebrates. *J. Leukoc. Biol.* 58:128-136.
- Mashburn, L. M., A. M. Jett, D. R. Akins, and M. Whiteley. 2005.** *Staphylococcus aureus* serves as an iron source for *Pseudomonas aeruginosa* during in vivo coculture. *J. Bacteriol.* 187:554-566.
- Matheson, N. R., P. S. Wong, and J. Travis. 1979.** Enzymatic inactivation of human alpha-1-proteinase inhibitor by neutrophil myeloperoxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 88:402-409.
- Mattick, J. S. 2002.** Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:289-314.
- Mayer-Scholl, A., P. Averhoff, and A. Zychlinsky. 2004.** How do neutrophils and pathogens interact? *Curr. Opin. Microbiol.* 7:62-66.
- Mayerle, J., J. Schnekenburger, B. Kruger, J. Kellermann, M. Ruthenburger, F. U. Weiss, A. Nalli, W. Domschke, and M. M. Lerch. 2005.** Extracellular cleavage of E-cadherin by leukocyte elastase during acute experimental pancreatitis in rats. *Gastroenterology* 129:1251-1267.
- Melrose, J., P. Ghosh, T. K. Taylor, and J. L. Andrews. 1992.** The serine proteinase inhibitory proteins of the human intervertebral disc: their isolation, characterization and variation with ageing and degeneration. *Matrix* 12:456-470.
- Miao, Z., B. A. Premack, Z. Wei, Y. Wang, C. Gerard, H. Showell, M. Howard, T. J. Schall, and R. Berahovich. 2007.** Proinflammatory proteases liberate a discrete high-affinity functional FPRL1 (CCR12) ligand from CCL23. *J. Immunol.* 178:7395-7404.

Middelhoven, P. J., A. Ager, D. Roos, and A. J. Verhoeven. 1997. Involvement of a metalloprotease in the shedding of human neutrophil Fc gammaRIIIB. *FEBS Lett.* 414:14-18.

Mizgerd, J. P. 2008. Acute lower respiratory tract infection. *N. Engl. J. Med.* 358:716-727.

Mocsai, A., E. Ligeti, C. A. Lowell, and G. Berton. 1999. Adhesion-dependent degranulation of neutrophils requires the Src family kinases Fgr and Hck. *J. Immunol.* 162:1120-1126.

Moore, A. R., A. Appelboam, K. Kawabata, J. A. Da Silva, D. D'Cruz, G. Gowland, and D. A. Willoughby. 1999. Destruction of articular cartilage by alpha 2 macroglobulin elastase complexes: role in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 58:109-113.

Morihara, K., H. TSUZUKI, T. OKA, H. INOUE, and M. EBATA. 1965. PSEUDOMONAS AERUGINOSA ELASTASE. ISOLATION, CRYSTALLIZATION, AND PRELIMINARY CHARACTERIZATION. *J. Biol. Chem.* 240:3295-3304.

Mueller, R. B., A. Skapenko, M. Grunke, J. Wendler, B. Stuhlmuller, J. R. Kalden, and H. Schulze-Koops. 2005. Regulation of myeloid cell function and major histocompatibility complex class II expression by tumor necrosis factor. *Arthritis Rheum.* 52:451-460.

Nagai, Y., S. Akashi, M. Nagafuku, M. Ogata, Y. Iwakura, S. Akira, T. Kitamura, A. Kosugi, M. Kimoto, and K. Miyake. 2002. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.* 3:667-672.

Nathan, C. F. 1987. Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *J. Clin. Invest* 80:1550-1560.

Nestorovich, E. M., E. Sugawara, H. Nikaido, and S. M. Bezrukov. 2006. Pseudomonas aeruginosa porin OprF: properties of the channel. *J. Biol. Chem.* 281:16230-16237.

Nicas, T. I. and B. H. Iglewski. 1984. Isolation and characterization of transposon-induced mutants of Pseudomonas aeruginosa deficient in production of exoenzyme S. *Infect. Immun.* 45:470-474.

Nicas, T. I., J. Bradley, J. E. Lochner, and B. H. Iglewski. 1985. The role of exoenzyme S in infections with *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* 152:716-721.

Niemann, C. U., J. B. Cowland, P. Klausen, J. Askaa, J. Calafat, and N. Borregaard. 2004. Localization of serglycin in human neutrophil granulocytes and their precursors. *J. Leukoc. Biol.* 76:406-415.

Nikaido, H., K. Nikaido, and S. Harayama. 1991. Identification and characterization of porins in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* 266:770-779.

Nishimoto, N., K. Yoshizaki, H. Tagoh, M. Monden, S. Kishimoto, T. Hirano, and T. Kishimoto. 1989. Elevation of serum interleukin 6 prior to acute phase proteins on the inflammation by surgical operation. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 50:399-401.

Nishiya, H., O. Kunii, and M. Noda. 1993. Priming effect of pseudomonal leukocidin on chemiluminescence response of rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Microbiol. Immunol.* 37:531-536.

Nufer, O., M. Corbett, and A. Walz. 1999. Amino-terminal processing of chemokine ENA-78 regulates biological activity. *Biochemistry* 38:636-642.

Odeberg, H. and I. Olsson. 1976. Mechanisms for the microbicidal activity of cationic proteins of human granulocytes. *Infect. Immun.* 14:1269-1275.

Owen, C. A., M. A. Campbell, P. L. Sannes, S. S. Boukedes, and E. J. Campbell. 1995. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: a novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *J. Cell Biol.* 131:775-789.

Park, S. and D. R. Galloway. 1995. Purification and characterization of LasD: a second staphylolytic proteinase produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 16:263-270.

Park, S. and D. R. Galloway. 1998. *Pseudomonas aeruginosa* LasD processes the inactive LasA precursor to the active protease form. *Arch. Biochem. Biophys.* 357:8-12.

- Pham, C. T. and T. J. Ley. 1999.** Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:8627-8632.
- Pham, C. T. 2006.** Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 6:541-550.
- Popper, L. and D. Knorr. 1997.** Inactivation of yeast and filamentous fungi by the lactoperoxidase-hydrogen peroxide-thiocyanate-system. *Nahrung* 41:29-33.
- Porteu, F., M. Brockhaus, D. Wallach, H. Engelmann, and C. F. Nathan. 1991.** Human neutrophil elastase releases a ligand-binding fragment from the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor. Comparison with the proteolytic activity responsible for shedding of TNF receptors from stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.* 266:18846-18853.
- Pourtois, M., C. Binet, T. N. Van, P. R. Courtois, A. Vandenabeele, and L. Thirty. 1991.** Saliva can contribute in quick inhibition of HIV infectivity. *AIDS* 5:598-600.
- Preston, G. A., C. S. Zarella, W. F. Pendergraft, III, E. H. Rudolph, J. J. Yang, S. B. Sekura, J. C. Jennette, and R. J. Falk. 2002.** Novel effects of neutrophil-derived proteinase 3 and elastase on the vascular endothelium involve in vivo cleavage of NF-kappaB and proapoptotic changes in JNK, ERK, and p38 MAPK signaling pathways. *J. Am. Soc. Nephrol.* 13:2840-2849.
- Ramos, C. D., K. S. Fernandes, C. Canetti, M. M. Teixeira, J. S. Silva, and F. Q. Cunha. 2006.** Neutrophil recruitment in immunized mice depends on MIP-2 inducing the sequential release of MIP-1alpha, TNF-alpha and LTB(4). *Eur. J. Immunol.* 36:2025-2034.
- Rao, R. M., T. V. Betz, D. J. Lamont, M. B. Kim, S. K. Shaw, R. M. Froio, F. Baleux, F. renzana-Seisdedos, R. Alon, and F. W. Lusinskas. 2004.** Elastase release by transmigrating neutrophils deactivates endothelial-bound SDF-1alpha and attenuates subsequent T lymphocyte transendothelial migration. *J. Exp. Med.* 200:713-724.
- Rashid, M. H., K. Rumbaugh, L. Passador, D. G. Davies, A. N. Hamood, B. H. Iglewski, and A. Kornberg. 2000.** Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum

sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97:9636-9641.

Rawling, E. G., N. L. Martin, and R. E. Hancock. 1995. Epitope mapping of the *Pseudomonas aeruginosa* major outer membrane porin protein OprF. *Infect. Immun.* 63:38-42.

Reeves, E. P., H. Lu, H. L. Jacobs, C. G. Messina, S. Bolsover, G. Gabella, E. O. Potma, A. Warley, J. Roes, and A. W. Segal. 2002. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. *Nature* 416:291-297.

Reichel, P. H., C. Seemann, E. Csernok, J. M. Schroder, A. Muller, W. L. Gross, and H. Schultz. 2003. Bactericidal/permeability-increasing protein is expressed by human dermal fibroblasts and upregulated by interleukin 4. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* 10:473-475.

Rello, J., C. Lorente, E. Diaz, M. Bodi, C. Boque, A. Sandiumenge, and J. M. Santamaria. 2003. Incidence, etiology, and outcome of nosocomial pneumonia in ICU patients requiring percutaneous tracheotomy for mechanical ventilation. *Chest* 124:2239-2243.

Remold-O'Donnell, E. and D. Parent. 1995. Specific sensitivity of CD43 to neutrophil elastase. *Blood* 86:2395-2402.

Renesto, P., M. Si-Tahar, M. Moniatte, V. Balloy, D. A. Van, D. Pidard, and M. Chignard. 1997. Specific inhibition of thrombin-induced cell activation by the neutrophil proteinases elastase, cathepsin G, and proteinase 3: evidence for distinct cleavage sites within the aminoterminal domain of the thrombin receptor. *Blood* 89:1944-1953.

Rifkin, I. R., E. A. Leadbetter, L. Busconi, G. Viglianti, and A. Marshak-Rothstein. 2005. Toll-like receptors, endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunol. Rev.* 204:27-42.

Roach, J. C., G. Glusman, L. Rowen, A. Kaur, M. K. Purcell, K. D. Smith, L. E. Hood, and A. Aderem. 2005. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102:9577-9582.

- Robertson, S. E., J. D. Young, S. Kitson, A. Pitt, J. Evans, J. Roes, D. Karaoglu, L. Santora, T. Ghayur, F. Y. Liew, J. A. Gracie, and I. B. McInnes. 2006.** Expression and alternative processing of IL-18 in human neutrophils. *Eur. J. Immunol.* 36:722-731.
- Robinson, P., R. Carzino, D. Armstrong, and A. Olinsky. 2003.** Pseudomonas cross-infection from cystic fibrosis patients to non-cystic fibrosis patients: implications for inpatient care of respiratory patients. *J. Clin. Microbiol.* 41:5741.
- Rocker, G. M., M. S. Wiseman, D. Pearson, and D. J. Shale. 1988.** Neutrophil degranulation and increased pulmonary capillary permeability following oesophagectomy: a model of early lung injury in man. *Br. J. Surg.* 75:883-886.
- Rogan, M. P., P. Geraghty, C. M. Greene, S. J. O'Neill, C. C. Taggart, and N. G. McElvaney. 2006.** Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence. *Respir. Res.* 7:29.
- Ruddle, N. H. 1992.** Tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta). *Curr. Opin. Immunol.* 4:327-332.
- Ryu, O. H., S. J. Choi, E. Firatli, S. W. Choi, P. S. Hart, R. F. Shen, G. Wang, W. W. Wu, and T. C. Hart. 2005.** Proteolysis of macrophage inflammatory protein-1alpha isoforms LD78beta and LD78alpha by neutrophil-derived serine proteases. *J. Biol. Chem.* 280:17415-17421.
- Sadallah, S., C. Hess, S. Miot, O. Spertini, H. Lutz, and J. A. Schifferli. 1999.** Elastase and metalloproteinase activities regulate soluble complement receptor 1 release. *Eur. J. Immunol.* 29:3754-3761.
- Salvesen, G. and J. J. Enghild. 1990.** An unusual specificity in the activation of neutrophil serine proteinase zymogens. *Biochemistry* 29:5304-5308.
- Sambrano, G. R., W. Huang, T. Faruqi, S. Mahrus, C. Craik, and S. R. Coughlin. 2000.** Cathepsin G activates protease-activated receptor-4 in human platelets. *J. Biol. Chem.* 275:6819-6823.

- Saukkonen, K., M. Leinonen, H. Abdillahi, and J. T. Poolman. 1989.** Comparative evaluation of potential components for group B meningococcal vaccine by passive protection in the infant rat and in vitro bactericidal assay. *Vaccine* 7:325-328.
- Savill, J. S., P. M. Henson, and C. Haslett. 1989.** Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanism. *J. Clin. Invest* 84:1518-1527.
- Scholz, D., B. Devaux, A. Hirche, B. Potzsch, B. Kropp, W. Schaper, and J. Schaper. 1996.** Expression of adhesion molecules is specific and time-dependent in cytokine-stimulated endothelial cells in culture. *Cell Tissue Res.* 284:415-423.
- Scuderi, P., P. A. Nez, M. L. Duerr, B. J. Wong, and C. M. Valdez. 1991.** Cathepsin-G and leukocyte elastase inactivate human tumor necrosis factor and lymphotoxin. *Cell Immunol.* 135:299-313.
- Sedor, J., L. Hogue, K. Akers, S. Boslaugh, J. Schreiber, and T. Ferkol. 2007.** Cathepsin-G interferes with clearance of *Pseudomonas aeruginosa* from mouse lungs. *Pediatr. Res.* 61:26-31.
- Segal, A. W. 2005.** How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 23:197-223.
- Sethi, S. 2000.** Bacterial infection and the pathogenesis of COPD. *Chest* 117:286S-291S.
- Sherry, B., Y. Horii, K. R. Manogue, U. Widmer, and A. Cerami. 1992.** Macrophage inflammatory proteins 1 and 2: an overview. *Cytokines* 4:117-130.
- Si-Tahar, M., D. Pidard, V. Balloy, M. Moniatte, N. Kieffer, D. A. Van, and M. Chignard. 1997.** Human neutrophil elastase proteolytically activates the platelet integrin α IIb β 3 through cleavage of the carboxyl terminus of the α IIb subunit heavy chain. Involvement in the potentiation of platelet aggregation. *J. Biol. Chem.* 272:11636-11647.
- Simpson, A. J., A. I. Maxwell, J. R. Govan, C. Haslett, and J. M. Sallenave. 1999.** Elafin (elastase-specific inhibitor) has anti-microbial activity against gram-positive and gram-negative respiratory pathogens. *FEBS Lett.* 452:309-313.

- Singh, P. K., M. R. Parsek, E. P. Greenberg, and M. J. Welsh. 2002.** A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature* 417:552-555.
- Six, D. A. and E. A. Dennis. 2000.** The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim. Biophys. Acta* 1488:1-19.
- Smith, K. D., E. ndersen-Nissen, F. Hayashi, K. Strobe, M. A. Bergman, S. L. Barrett, B. T. Cookson, and A. Aderem. 2003.** Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat. Immunol.* 4:1247-1253.
- Sonawane, A., J. Jyot, R. During, and R. Ramphal. 2006.** Neutrophil elastase, an innate immunity effector molecule, represses flagellin transcription in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 74:6682-6689.
- Soong, G., B. Reddy, S. Sokol, R. Adamo, and A. Prince. 2004.** TLR2 is mobilized into an apical lipid raft receptor complex to signal infection in airway epithelial cells. *J. Clin. Invest* 113:1482-1489.
- Sorensen, O., K. Arnljots, J. B. Cowland, D. F. Bainton, and N. Borregaard. 1997.** The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood* 90:2796-2803.
- Spertini, O., F. W. Lusinskas, G. S. Kansas, J. M. Munro, J. D. Griffin, M. A. Gimbrone, Jr., and T. F. Tedder. 1991.** Leukocyte adhesion molecule-1 (LAM-1, L-selectin) interacts with an inducible endothelial cell ligand to support leukocyte adhesion. *J. Immunol.* 147:2565-2573.
- Stover, C. K., X. Q. Pham, A. L. Erwin, S. D. Mizoguchi, P. Warrenner, M. J. Hickey, F. S. Brinkman, W. O. Hufnagle, D. J. Kowalik, M. Lagrou, R. L. Garber, L. Goltry, E. Tolentino, S. Westbrook-Wadman, Y. Yuan, L. L. Brody, S. N. Coulter, K. R. Folger, A. Kas, K. Larbig, R. Lim, K. Smith, D. Spencer, G. K. Wong, Z. Wu, I. T. Paulsen, J. Reizer, M. H. Saier, R. E. Hancock, S. Lory, and M. V. Olson. 2000.** Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 406:959-964.

Szabo, C. 2003. Role of flagellin in the pathogenesis of shock and acute respiratory distress syndrome: therapeutic opportunities. *Crit Care Med.* 31:S39-S45.

Taggart, C. C., S. A. Cryan, S. Weldon, A. Gibbons, C. M. Greene, E. Kelly, T. B. Low, S. J. O'Neill, and N. G. McElvaney. 2005. Secretory leucoprotease inhibitor binds to NF-kappaB binding sites in monocytes and inhibits p65 binding. *J. Exp. Med.* 202:1659-1668.

Takagi, K., M. Takagi, S. Kanangat, K. J. Warrington, H. Shigemitsu, and A. E. Postlethwaite. 2005. Modulation of TNF-alpha gene expression by IFN-gamma and pamidronate in murine macrophages: regulation by STAT1-dependent pathways. *J. Immunol.* 174:1801-1810.

Takahashi, H., T. Nukiwa, K. Yoshimura, C. D. Quick, D. J. States, M. D. Holmes, J. Whang-Peng, T. Knutsen, and R. G. Crystal. 1988. Structure of the human neutrophil elastase gene. *J. Biol. Chem.* 263:14739-14747.

Takeda, K. 2005. [Toll-like receptor]. *Nihon Rinsho Meneki. Gakkai Kaishi* 28:309-317.

Taylor, J. C., I. P. Crawford, and T. E. Hugli. 1977. Limited degradation of the third component (C3) of human complement by human leukocyte elastase (HLE): partial characterization of C3 fragments. *Biochemistry* 16:3390-3396.

Tekamp-Olson, P., C. Gallegos, D. Bauer, J. McClain, B. Sherry, M. Fabre, D. S. van, and A. Cerami. 1990. Cloning and characterization of cDNAs for murine macrophage inflammatory protein 2 and its human homologues. *J. Exp. Med.* 172:911-919.

Tenovuo, J., S. Hannuksela, and M. Lenander-Lumikari. 1995. Effects of delmopinol on antimicrobial peroxidase systems and lysozyme in vitro and in human whole saliva. *Eur. J. Oral Sci.* 103:247-252.

Tkalcevic, J., M. Novelli, M. Phylactides, J. P. Iredale, A. W. Segal, and J. Roes. 2000. Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity.* 12:201-210.

- Tkalcevic, J., M. Novelli, M. Phylactides, J. P. Iredale, A. W. Segal, and J. Roes. 2000.** Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity*. 12:201-210.
- Tonz, M., T. Mihaljevic, L. K. von Segesser, J. Fehr, E. R. Schmid, and M. I. Turina. 1995.** Acute lung injury during cardiopulmonary bypass. Are the neutrophils responsible? *Chest* 108:1551-1556.
- Touqui, L., M. Paya, F. Thouron, A. Guiyoule, M. L. Zarantonelli, D. Leduc, Y. Wu, M. K. Taha, and J. M. Alonso. 2005.** Neisseria meningitidis pili induce type-IIA phospholipase A2 expression in alveolar macrophages. *FEBS Lett.* 579:4923-4927.
- Turkington, P. T. 1991.** Degradation of human factor X by human polymorphonuclear leucocyte cathepsin G and elastase. *Haemostasis* 21:111-116.
- Underhill, D. M. and A. Ozinsky. 2002.** Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.* 20:825-852.
- Wagner, J. G. and R. A. Roth. 1999.** Neutrophil migration during endotoxemia. *J. Leukoc. Biol.* 66:10-24.
- Wagner, J. G. and R. A. Roth. 2000.** Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol. Rev.* 52:349-374.
- Walsh, D. E., C. M. Greene, T. P. Carroll, C. C. Taggart, P. M. Gallagher, S. J. O'Neill, and N. G. McElvaney. 2001.** Interleukin-8 up-regulation by neutrophil elastase is mediated by MyD88/IRAK/TRAF-6 in human bronchial epithelium. *J. Biol. Chem.* 276:35494-35499.
- Watorek, W., H. H. van, and J. Travis. 1993.** The isoforms of human neutrophil elastase and cathepsin G differ in their carbohydrate side chain structures. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 374:385-393.
- Weinrauch, Y., D. Drujan, S. D. Shapiro, J. Weiss, and A. Zychlinsky. 2002.** Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature* 417:91-94.

- Weinrauch, Y., D. Drujan, S. D. Shapiro, J. Weiss, and A. Zychlinsky. 2002.** Neutrophil elastase targets virulence factors of enterobacteria. *Nature* 417:91-94.
- Weiss, S. J. 1989.** Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* 320:365-376.
- Wiener-Kronish, J. P., M. A. Gropper, and M. A. Matthay. 1990.** The adult respiratory distress syndrome: definition and prognosis, pathogenesis and treatment. *Br. J. Anaesth.* 65:107-129.
- Wijkstrom-Frei, C., S. El-Chemaly, R. li-Rachedi, C. Gerson, M. A. Cobas, R. Forteza, M. Salathe, and G. E. Conner. 2003.** Lactoperoxidase and human airway host defense. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 29:206-212.
- Williams, M. A. and J. S. Solomkin. 1999.** Integrin-mediated signaling in human neutrophil functioning. *J. Leukoc. Biol.* 65:725-736.
- Williams, S. E., T. I. Brown, A. Roghanian, and J. M. Sallenave. 2006.** SLPI and elafin: one glove, many fingers. *Clin. Sci. (Lond)* 110:21-35.
- Wilson, C. B., P. W. Jones, C. J. O'Leary, D. M. Hansell, P. J. Cole, and R. Wilson. 1997.** Effect of sputum bacteriology on the quality of life of patients with bronchiectasis. *Eur. Respir. J.* 10:1754-1760.
- Wine, J. J. 1999.** The genesis of cystic fibrosis lung disease. *J. Clin. Invest* 103:309-312.
- Witko-Sarsat, V., P. Rieu, B. scamps-Latscha, P. Lesavre, and L. Halbwachs-Mecarelli. 2000.** Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. *Lab Invest* 80:617-653.
- Wittamer, V., B. Bondue, A. Guillabert, G. Vassart, M. Parmentier, and D. Communi. 2005.** Neutrophil-mediated maturation of chemerin: a link between innate and adaptive immunity. *J. Immunol.* 175:487-493.

Woodruff, W. A., T. R. Parr, Jr., R. E. Hancock, L. F. Hanne, T. I. Nicas, and B. H. Iglewski. 1986. Expression in *Escherichia coli* and function of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F. *J. Bacteriol.* 167:473-479.

Worlitzsch, D., R. Tarran, M. Ulrich, U. Schwab, A. Cekici, K. C. Meyer, P. Birrer, G. Bellon, J. Berger, T. Weiss, K. Botzenhart, J. R. Yankaskas, S. Randell, R. C. Boucher, and G. Doring. 2002. Effects of reduced mucus oxygen concentration in airway *Pseudomonas* infections of cystic fibrosis patients. *J. Clin. Invest* 109:317-325.

Wu, L., O. Estrada, O. Zaborina, M. Bains, L. Shen, J. E. Kohler, N. Patel, M. W. Musch, E. B. Chang, Y. X. Fu, M. A. Jacobs, M. I. Nishimura, R. E. Hancock, J. R. Turner, and J. C. Alverdy. 2005. Recognition of host immune activation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Science* 309:774-777.

Yahr, T. L., A. J. Vallis, M. K. Hancock, J. T. Barbieri, and D. W. Frank. 1998. ExoY, an adenylate cyclase secreted by the *Pseudomonas aeruginosa* type III system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:13899-13904.

Zimmer, M., R. L. Medcalf, T. M. Fink, C. Mattmann, P. Lichter, and D. E. Jenne. 1992. Three human elastase-like genes coordinately expressed in the myelomonocyte lineage are organized as a single genetic locus on 19pter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:8215-8219.

Zlotnik, A. and O. Yoshie. 2000. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity.* 12:121-127.

Rôle de l'élastase du neutrophile dans les infections pulmonaires à
Pseudomonas aeruginosa.

RESUME :

P. aeruginosa est un pathogène fréquemment isolé dans les infections pulmonaires. Ces dernières sont caractérisées par le recrutement massif des polynucléaires neutrophiles au site infectieux. La fonction principale des neutrophiles est d'éliminer le pathogène en utilisant deux systèmes : un système oxydatif et un système non oxydatif. Parmi les molécules du système non oxydatif, on trouve l'élastase du neutrophile (NE). Le rôle antibactérien de la NE dans la protection de l'hôte contre *P. aeruginosa* et dans la modulation de la réponse inflammatoire n'ont pas été encore élucidés.

Des souris déficientes en NE (NE^{-/-}) et des souris sauvages (WT) ont été exposées à *P. aeruginosa* selon un modèle d'infection à pneumonie aiguë. Nos résultats ont montré que les souris NE^{-/-} sont plus susceptibles à l'infection que les souris WT. L'étude du mécanisme antibactérien de la NE a révélé que (i) l'enzyme est bactéricide contre différentes souches de *P. aeruginosa* et (ii) la NE cible OprF, une porine majeure essentielle au maintien de l'intégrité de *P. aeruginosa* et à la reconnaissance de la réponse immunitaire de l'hôte. Ensuite, nous avons démontré que la NE régule la réponse inflammatoire suite à l'infection pulmonaire par *P. aeruginosa*. En effet, la NE induit l'expression des médiateurs pro-inflammatoires MIP-2, TNF- α et l'IL-6 (régulation transcriptionnelle). L'étude du mécanisme de cette régulation a indiqué que la NE ciblerait, entre autres, le récepteur TLR4.

L'ensemble de ces résultats indique que la NE protège l'hôte de la morbidité et la mortalité associées aux infections pulmonaires à *P. aeruginosa* et que cette enzyme joue un rôle double en exerçant une activité bactéricide directe sur ce pathogène et en modulant la réponse inflammatoire.

MOTS CLES :

P. aeruginosa, Poumon, Pneumonie à *P. aeruginosa*, Polynucléaire neutrophile, élastase du neutrophile, inflammation, cytokines.