

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR –STRASBOURG I

U.F.R. des Sciences de la Vie et de la Terre

THESE

Présentée par

Claire GASNIER

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG

**Nouvelles données sur les relations structure/fonction
des chromogranines et leurs applications**

Soutenue le *23 juin 2006* devant la commission d'examen :

Mr Dominique AUNIS (Examineur)

Mme Marie-Hélène METZ-BOUTIGUE (Directeur de thèse)

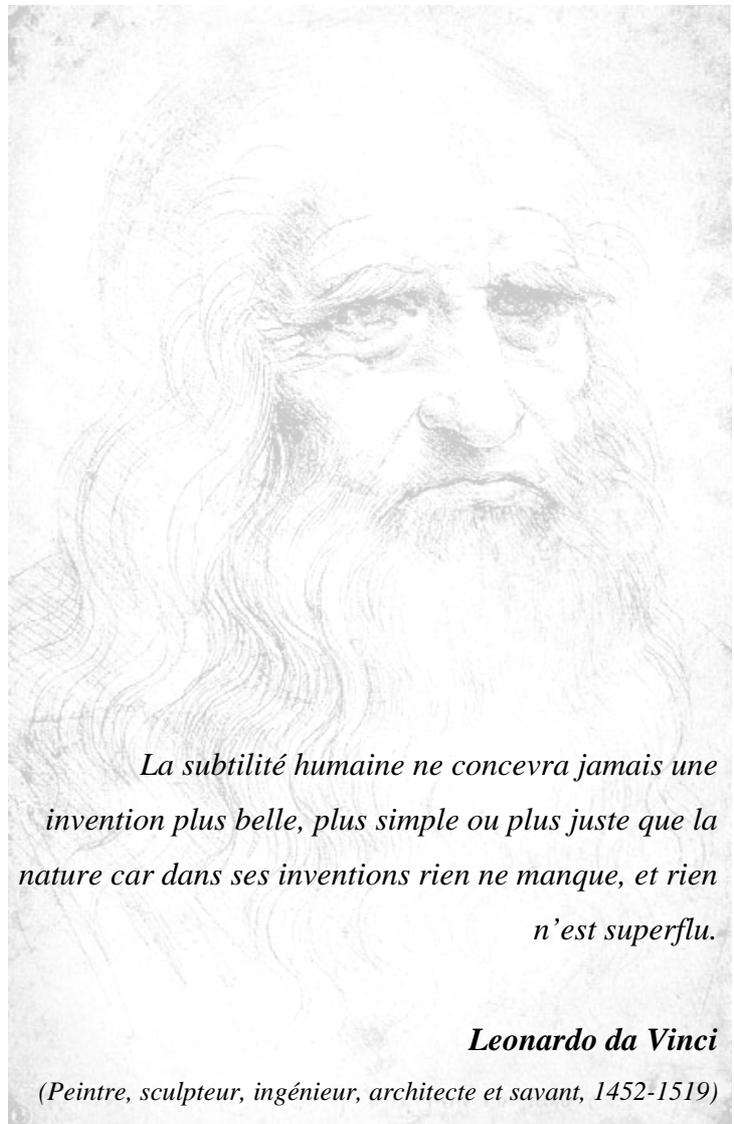
Mr Yves-Marie PIEMONT (Rapporteur interne)

Mme Françoise SCHOENTGEN (Rapporteur externe)

Mr Joël MAZURIER (Rapporteur externe)

Mme Marie CHARVERON ((Examineur)

A Térence et   Philippe



*La subtilité humaine ne concevra jamais une
invention plus belle, plus simple ou plus juste que la
nature car dans ses inventions rien ne manque, et rien
n'est superflu.*

Leonardo da Vinci

(Peintre, sculpteur, ingénieur, architecte et savant, 1452-1519)

Merci !

Ce travail a été effectué dans l'unité Inserm 575, Physiopathologie du système nerveux. Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Dr *Dominique Aunis*, directeur de recherche à l'Inserm et directeur de l'U575, pour m'avoir accueillie dans son unité et m'avoir donné l'opportunité de réaliser mes recherches dans des conditions très favorables.

Je dois un grand remerciement au Dr *Marie-Hélène Metz-Boutigue* pour m'avoir accueillie dans son équipe comme ingénieure, et m'avoir permis cependant de réaliser ce travail de thèse. Merci pour sa confiance, son soutien, sa compréhension et ses encouragements. Merci encore pour ses conseils scientifiques avisés, ainsi que pour son intérêt dans mes recherches.

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements au Professeur *Yves-Marie Piemont*, ainsi qu'aux docteurs *Françoise Schoentgen*, *Marie Charveron*, *Joël Mazurier* pour avoir chaleureusement accepté de juger ce travail, et pris la peine de lire ce manuscrit.

Je remercie également les docteurs *Jean-Claude Voegel*, *Christophe Egles* et *Olivier Etienne* de l'U595 pour m'avoir permis de collaborer avec succès à un projet enrichissant et prometteur.

Ma reconnaissance va au Pr *Youssef Haikel*, doyen de la faculté d'odontologie, qui m'a soutenu financièrement cette année.

Je remercie particulièrement *Jean-Marc Strub* pour son aide en spectrométrie de masse, et *Sylvie Grosch* pour son expertise en microscopie confocale. Un grand merci à *Corinne Taddéi* (une autre grande amatrice de thé) pour la relecture attentive et critique de ce manuscrit.

Je remercie tous mes collègues de laboratoire, passés et présents, cette thèse n'aurait pas été un plaisir sans quelques personnes formidables : *Yannick Goumon*, ton aide et tes conseils me seront utiles encore longtemps. Pour ce que tu m'as donné, reçois ici mon amitié, mon respect, et ma profonde reconnaissance. Il n'y a pas de travail sans plaisir ; la joie, la bonne humeur et l'humour, sont autant d'atouts qui contribuent au bon déroulement d'une thèse, pour tout cela je tiens à adresser mes plus vifs remerciements à *Elise* (notre grande sœur à tous), *Patricia* (surtout ne change rien, mais avec une double dose de chocolat), *Dan* (merci pour l'enrichissement culturel), *Martine S.* (conserve bien précieusement tes amitiés pâtisseries...), *Aziza* (bon courage avec les parasites), *Peiman* (que tu es beau !), *Arnaud* (Président du Comité d'Extermination par Phagocytose des Crayons Innocents), *Bernard* (désolée, je ne m'appelle toujours pas Hélène), *François* (désolée que nous n'ayons pas eu le temps de faire plus ample connaissance), qui ont su avec beaucoup de stoïcisme supporter et peut-être parfois apprécier (?) mes blagues et mes jeux de mots (Elise, je compte sur toi pour reprendre dignement le flambeau !).

Tous les stagiaires qui m'ont croisée pendant ces 5 années, et plus particulièrement *Véronique Piel*, *Céline Trometer*, et *Nathalie Tien-Mi-Tiee*, 3 stagiaires que j'ai pu encadrer avec plaisir, mais aussi *Perrine*, *Aurélia*, *Mélanie*, *Priscille*, *Thierry*, *Julien*, *Abdeslam*, *Stéphane* et tous les autres, merci à tous les étudiants qui sont passés dans le laboratoire, pour

les bons moments que nous avons partagés, j'ai plus appris grâce à vous que je ne vous ai appris...

Je n'oublie pas ceux qui sont déjà partis vers des contrées plus lointaines (c'est-à-dire plus loin que l'Esplanade) : *Jenny*, ma voisine de paillasse pendant 3 ans, merci de ta spontanéité, de ta simplicité et de ta sincérité, je te souhaite un avenir riche et créatif, *Amar* et *Jean-Eric*, souriants et drôles, soyez de gentils papas, *Gérard Nullans*, merci de tes qualités humaines, profite pleinement de ta retraite.

Aux personnes croisées au détour d'un couloir (ou dans la pièce 3401), un sourire, quelques mots, ou blagues, merci pour cela, *Delphine*, *Stella*, *Laetitia*, *Martine R*, *Olivier*, *Patrice*, *Jean-Paul*... Merci à toutes les personnes de l'unité qui ont, grâce à leurs conseils, contribué à l'avancement de mes travaux de thèse.

La thèse est avant tout une expérience humaine où se succèdent certitudes et désillusions, enthousiasme et découragement. Je voudrais exprimer toute ma gratitude à celles qui ont contribué à me remonter le moral durant cette thèse, qu'elles soient depuis peu docteur, ou en passe de l'être, *Isabelle*, *Céline M*, et *Céline S*, je vous remercie pour ces 5 années d'amitié. Vous avez été là quand j'en ai eu besoin, c'est beaucoup, pour cela je vous dis un grand merci.

Et parce qu'il y a une vie hors du labo, je tiens à remercier tous ceux qui m'ont encouragée et réconfortée dans les moments difficiles : *Sara Hardy*, *Louis Calaferte*, *Emmanuel Decelle*, *Priscilla Decelle*, *Terry Pratchett*, *Céline Buyse*, *Marie Gaumé*, *JK Rowling*, *Jérôme Rageot*, *Fabrice Goulven*, *Vincent Rinche*, *Didier van Cauwelaert*, *Marlène Cot*, *Céline Théron*, *Christelle Gabaston*, *Emeline Fabre*, *Douglas Adams*, *Johanna Gourmaud*, *Delphine Théard* ...

Je tiens à remercier mes parents qui ont toujours veillé de près, malgré la distance, à mon bien-être avec une confiance sans borne. *Sylvie*, maman, grâce à toi maintenant je suis une grande fille, mais la petite fille qui demeure en moi aura toujours besoin de toi. *Gérard*, papa, tu as su me faire grandir dans l'amour de la science, merci. *Vincent*, qu'il est bon de te connaître mon frère.

Mes grands parents, *René* et *Simone*, qui m'ont toujours soutenu, et ont fait les frais de mes premières expériences scientifiques. Mamie *Berthe*, là haut j'espère que tu es heureuse, merci pour tout ce que tu as été.

Et enfin, à ceux qui sont jour après jour à mes côtés, me soutiennent, me supportent, me connaissent par cœur. Pendant toutes ces années, j'ai toujours pu compter sur un soutien indéfectible, riche en amour. Merci *Philippe*, parce que c'est toi. *Térence*, merci mon bébé, j'ai du mal à croire que tu sois déjà si grand, tu es ma joie, merci d'être.

Merci simplement parce que vous êtes là.

Les mots ici ne diront pas tout.

Merci de tout mon cœur.

Sommaire

SOMMAIRE	a
-----------------	----------

ABREVIATIONS	h
---------------------	----------

FIGURES	l
----------------	----------

TABLEAUX	o
-----------------	----------

Données bibliographiques

INTRODUCTION	- 1 -
---------------------	--------------

CHAPITRE I : LES CELLULES CHROMAFFINES DE LA GLANDE SURRENALE :

NOTRE MODELE D'ETUDE	- 5 -
-----------------------------	--------------

I- LES GLANDES SURRENALES	- 5 -
----------------------------------	--------------

II- LES CELLULES CHROMAFFINES	- 7 -
--------------------------------------	--------------

III- LES GRANULES DE SECRETION	- 9 -
---------------------------------------	--------------

IV- IMPLICATION DES CELLULES CHROMAFFINES LORS DES ETATS DE STRESS	- 11 -
---	---------------

CHAPITRE II : RELATIONS ENTRE SYSTEME NERVEUX ET SYSTEME

IMMUNITAIRE	- 13 -
--------------------	---------------

I- LES FACTEURS DE L'IMMUNITE	- 13 -
--------------------------------------	---------------

1- INTRODUCTION	- 13 -
-----------------	--------

2- L'IMMUNITE ADAPTATIVE	- 14 -
--------------------------	--------

3- L'IMMUNITE NATURELLE OU INNEE	- 17 -
----------------------------------	--------

✓ Effecteurs mis en jeu	- 18 -
-------------------------	--------

4- ROLE DE L'IMMUNITE INNEE DANS LA STIMULATION DES REPNSES IMMUNITAIRES ADAPTATIVES	- 20 -
--	--------

II- RELATIONS ENTRE LE SYSTEME NERVEUX ET LE SYSTEME IMMUNITAIRE INNE	- 22 -
--	---------------

1- INTRODUCTION	- 22 -
-----------------	--------

2- LES LIENS ENTRE LE SNC ET L'IMMUNITE	- 22 -
---	--------

3- CONTROLE DU SNS SUR L'IMMUNITE	- 24 -
✓ Effets du Neuropeptide Y sur les cellules immunitaires	- 26 -
4- EFFETS DES FACTEURS DE LA SURRENALE SUR L'IMMUNITE	- 26 -
a- L'axe HHS : agent de la régulation de la réponse immunitaire	- 26 -
b- Rôle de la médullo-surrénale sur l'immunité	- 27 -
5- CONCLUSION	- 28 -
CHAPITRE III : LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS (PAMS)	- 30 -
I- INTRODUCTION	- 30 -
II- LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS CATIONIQUES	- 30 -
1- PEPTIDES LINEAIRES EN HELICE α AMPHIPATHIQUE	- 31 -
2- LES PEPTIDES LINEAIRES RICHES EN PROLINE	- 32 -
3- LES PEPTIDES ORGANISES EN FEUILLET β	- 33 -
III- ACTION DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS DANS LE CADRE DE LA REPOSE IMMUNITAIRE	- 34 -
1- INTRODUCTION	- 34 -
2- IMPLICATION DES PAMS CATIONIQUES DANS L'IMMUNITE	- 34 -
3- PEPTIDES EXPRIMES CONJOINTEMENT AVEC DES ELEMENTS DU SYSTEME IMMUNITAIRE	- 35 -
4- ROLES PHYSIOPATHOLOGIQUES DES PAMS	- 36 -
5- ACTION DIRECTE DES PAMS SUR LES PATHOGENES	- 37 -
6- MODULATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE PAR LES PAMS	- 38 -
7- ACTIVATION DU SYSTEME IMMUNITAIRE PAR LES PAMS	- 39 -
8- SUPPRESSION DE L'INFLAMMATION MEDIEE PAR LES PAMS	- 40 -
9- LES PAMS COMME ADJUVANTS DANS L'IMMUNITE	- 41 -
10- MECANISME DE LA MODULATION DE L'IMMUNITE PAR LES PAMS	- 41 -
11- CONCLUSION	- 42 -
IV- MODES D'ACTION DIRECT DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS	- 42 -
1- LE MODELE BARREL-STAVE	- 43 -
2- LE MODELE CARPET-LIKE	- 44 -
3- LE MODELE TOROÏDAL OU WORMHOLE	- 44 -
4- AUTRES MODES D'ACTION DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS	- 44 -
V- APPLICATIONS THERAPEUTIQUES DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS	- 45 -
1- INTRODUCTION	- 45 -
2- ROLE DES PAMS CONTRE LES PATHOGENES	- 45 -
3- ROLE CONTRACEPTIF ET ANTITUMORAL	- 46 -
4- UNE VOIE POSSIBLE D'ADMINISTRATION DES PAMS	- 47 -
VI- CONCLUSION	- 49 -

CHAPITRE IV : LES CHROMOGRANINES / SECRETOGRANINES	- 50 -
I- LA FAMILLE DES GRANINES	- 50 -
II- LOCALISATION DES CHROMOGRANINES	- 50 -
III- MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DES CHROMOGRANINES	- 52 -
IV- FONCTIONS BIOLOGIQUES DES CHROMOGRANINES	- 53 -
V- LA CHROMOGRANINE A ET LA CHROMOGRANINE B	- 53 -
1- STRUCTURE PRIMAIRE DES CHROMOGRANINES	- 54 -
a- La CGA	- 54 -
b- La CGB	- 58 -
2- LES PEPTIDES DERIVES DES CHROMOGRANINES	- 60 -
a- La CGA	- 60 -
✓ Les vasostatines I et II	- 61 -
✓ La Prochromacine et La Chromacine	- 62 -
✓ La chromostatine	- 62 -
✓ La pancréastatine	- 63 -
✓ Le WE-14	- 63 -
✓ La catestatine	- 63 -
✓ La parastatine	- 64 -
✓ Protéolyse de la chromogranine A par la PC2	- 65 -
b- La CGB	- 65 -
✓ Le GAWK	- 66 -
✓ Le BAM -1745	- 66 -
✓ Le CCB (C-terminal Chromogranin B derived peptide)	- 66 -
✓ La Sécrétolytine	- 67 -
3- LOCALISATION DES CHROMOGRANINES	- 67 -
4- IMPLICATION DES CHROMOGRANINES DANS LES DESORDRES NEURODEGENERATIFS	- 68 -
a- La CGA	- 68 -
✓ La maladie de Parkinson	- 69 -
✓ La sclérose latérale amyotrophique	- 69 -
✓ La schizophrénie	- 69 -
✓ La maladie d'Alzheimer	- 69 -
✓ Activation des cellules microgliales	- 70 -
b- La CGB	- 70 -
✓ La schizophrénie	- 70 -
✓ La maladie de Creutzfeld-Jakob	- 70 -
5- UTILISATION DES CHROMOGRANINES COMME MARQUEUR DE TUMEURS NEUROENDOCRINES	- 71 -

a- La CGA	- 71 -
b- La CGB	- 72 -
6- FONCTION BIOLOGIQUE DES CHROMOGRANINES	- 72 -
a- La CGA	- 72 -
✓ Interaction CGA-SgIII	- 72 -
✓ Interaction de la CGA sur le récepteur de l'IP3	- 72 -
✓ Rôle dans les mécanismes de sécrétion	- 73 -
✓ Rôle de la CGA dans la circulation	- 74 -
b- La CGB	- 75 -
✓ Implication dans les phénomènes de sécrétion	- 75 -
✓ Rôle potentiel dans la transcription	- 75 -
VI- LA SECRETOGRANINE II	- 77 -
1- SYNTHÈSE ET EXPRESSION DE LA SGII	- 77 -
2- STRUCTURE PRIMAIRE ET MATURATION PROTEOLYTIQUE	- 78 -
3- LES PEPTIDES ISSUS DE LA MATURATION DE LA SGII	- 81 -
a- La sécrétoneurine	- 81 -
b- Le peptide EM-66	- 82 -
c- La mansérine	- 83 -
d- Le peptide AMENM	- 83 -
VII- CONCLUSION	- 84 -

Résultats expérimentaux

<u>CHAPITRE I : ANALYSE DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES DE LA CHROMOGRANINE B PRESENTE DANS LES GRANULES DE SECRETION DES CELLULES CHROMAFFINES BOVINES</u>	- 85 -
I- CONTEXTE DE L'ETUDE	- 85 -
II- RESULTATS ACQUIS AVANT MON ETUDE	- 86 -
III- PRINCIPAUX RESULTATS	- 88 -
1- PUBLICATION 1	- 88 -
2- STRATEGIE EXPERIMENTALE	- 88 -
a- Electrophorèse bidimensionnelle	- 88 -
b- Digestion de la CGB par l'endoprotéase Lys-C : analyse des fragments	- 89 -
c- Analyse du fragment naturel CGB ₁₋₁₉₂	- 89 -
d- Analyse du fragment naturel CGB ₅₆₄₋₆₂₆	- 89 -
IV- DISCUSSION-CONCLUSIONS	- 90 -

a- Les phosphorylations	- 90 -
b- Les glycosylations	- 90 -
c- Les sulfatations	- 91 -
d- Les oxydations	- 91 -
e- Le polymorphisme M/V	- 91 -
f- Conclusion	- 92 -
V- PERSPECTIVES	- 93 -

CHAPITRE II : ANALYSE PROTEOMIQUE DE LA MATURATION PROTEOLYTIQUE DE LA SECRETOGRANINE II CONTENUE DANS LES GRANULES DE SECRETION DES CELLULES CHROMAFFINES DE LA MEDULLO-SURRENALE BOVINE - 107 -

I- INTRODUCTION	- 107 -
II- STRATEGIE EXPERIMENTALE	- 109 -
III- RESULTATS	- 110 -
1- CARTOGRAPHIE DES FRAGMENTS DERIVES DE LA SGII	- 110 -
a- Electrophorèse bidimensionnelle	- 110 -
b- Identification des différents fragments dérivés de la Sg II	- 114 -
2- RECHERCHE ET LOCALISATION DES MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES	- 115 -
IV- CONCLUSION	- 119 -

CHAPITRE III : MISE EN EVIDENCE DE L'EXISTENCE DE PEPTIDES A ACTIVITES ANTIMICROBIENNES ET ANTIFONGIQUES DERIVES DE LA SECRETOGRANINE II - 121 -

I- INTRODUCTION	- 121 -
II- STRATEGIE EXPERIMENTALE	- 121 -
III- RESULTATS	- 122 -
1- RECHERCHE DE PEPTIDES ANTIMICROBIENS NATURELS	- 122 -
2- ANALYSE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE DE LA SECRETOGRANINE II ET DU PEPTIDE AMENM	- 122 -
3- ANALYSE DE LA SEQUENCE DE LA SGII BOVINE	- 122 -
4- ACTIVITES ANTIMICROBIENNES DES PEPTIDES SYNTHETIQUES (A-D)	- 126 -
5- ANALYSE DE L'INTERACTION DES PEPTIDES A _E ET C _E AVEC LE CHAMPIGNON FILAMENTEUX NEUROSPORA CRASSA	- 129 -
6- RECHERCHE DE SIMILARITE DES PEPTIDES RETENUS AVEC DES PEPTIDES ANTIMICROBIENS CONNUS	- 129 -

IV- CONCLUSION ET PERSPECTIVES	- 132 -
<hr/>	
<u>CHAPITRE IV : INSERTION D'UN PEPTIDE ANTIMICROBIEN DERIVE DE LA CHROMOGRANINE A DANS UNE NANOSTRUCTURE</u>	- 134 -
<hr/>	
I- CONTEXTE DE L'ETUDE	- 134 -
II- PRINCIPAUX RESULTATS	- 134 -
1- PUBLICATION 2	- 134 -
2- STRATEGIE EXPERIMENTALE	- 135 -
a- Construction des films de polyélectrolytes	- 135 -
b- Insertion de la chromofungine	- 135 -
c- Tests d'activité antifongique	- 135 -
d- Microscopie confocale	- 136 -
e- Tests de cytotoxicité	- 136 -
f- Etude in vivo	- 136 -
III- CONCLUSION ET PERSPECTIVES	- 137 -
<hr/>	
<u>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</u>	- 147 -
<hr/>	
<u>MATERIELS ET METHODES</u>	- 150 -
<hr/>	
I- PREPARATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE	- 150 -
1- PURIFICATION DES PROTEINES SOLUBLES DE LA MATRICE INTRAGRANULAIRE DES CELLULES CHROMAFFINES	- 150 -
II- DOSAGE PROTEIQUE	- 151 -
III- SYNTHÈSE PEPTIDIQUE	- 151 -
IV- METHODES DE PURIFICATION DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES	- 152 -
1- PREPARATION DE L'ECHANTILLON	- 152 -
2- CHROMATOGRAPHIE HPLC DE PHASE INVERSE	- 153 -
a- Préparation de la phase mobile	- 153 -
b- Séparation	- 153 -
3- CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION	- 154 -
4- CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE	- 154 -
a- Purification d'anticorps polyclonaux à partir de sérum de lapin	- 154 -
b- Fixation des anticorps sur la colonne d'affinité	- 155 -
c- Purification de l'échantillon	- 155 -
5- DESSALAGE DES ECHANTILLONS	- 155 -

V- ANALYSE DES PROTEINES PAR GELS D'ELECTROPHORESE	- 156 -
1- ELECTROPHORESE MONODIMENSIONNELLE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE	- 156 -
2- ELECTROPHORESE BIDIMENSIONNELLE	- 157 -
a- Isoélectrofocalisation	- 157 -
✓ Réhydratation	- 158 -
✓ Migration	- 158 -
b- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes	- 159 -
✓ Réduction alkylation des molécules	- 159 -
✓ Migration	- 160 -
3- COLORATION DES PROTEINES AU BLEU DE COOMASSIE	- 160 -
4- COLORATION DES PROTEINES AU NITRATE D'ARGENT	- 160 -
5- ÉLECTROTRANSFERT ET IMMUNODETECTION	- 161 -
6- PREPARATION D'ANTICORPS POLYCLONAUX	- 163 -
VI- ETUDES STRUCTURALES	- 163 -
1- SEQUENÇAGE PEPTIDIQUE	- 163 -
2- SPECTROMETRIE DE MASSE (MALDI-TOF)	- 163 -
3- DIGESTION TRYPSIQUE IN GEL	- 165 -
VII- CARACTERISATION DES ACTIVITES BIOLOGIQUES	- 166 -
1- ACTIVITE ANTIBACTERIENNE	- 166 -
2- ACTIVITE ANTIFONGIQUE	- 167 -
3- ACTIVITE HEMOLYTIQUE	- 167 -
VIII- REACTIONS CHIMIQUES ET ENZYMATIQUES	- 168 -
1- OXYDATION	- 168 -
2- DIGESTIONS PROTEOLYTIQUES	- 168 -
a- Endoprotéase Lys-C	- 168 -
b- Trypsine	- 168 -
IX- MICROSCOPIE CONFOCALE	- 168 -
X- METHODES BIOINFORMATIQUES	- 169 -
XI- ANALYSE STATISTIQUE	- 169 -
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	- 170 -
LISTE DES PUBLICATIONS	- 217 -
LISTE DES COMMUNICATIONS	- 218 -

Abréviations

ACE :	Angiotensin-Converting Enzyme
ACTH :	AdrenoCorticoTropin Hormone
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
ADP :	Adénosine DiPhosphate
AGE :	Adrenorphin-Generating Enzyme
AMP :	Adénosine MonoPhosphate
AMPC :	AMP cyclique
ANP :	Atrial Natriuretic Factor
ARN :	Acide RiboNucléique
ARNm :	ARN messenger
ATP :	Adénosine TriPhosphate
AVR2 :	Arginine Vasopressin Receptor 2
B3AR :	Beta-3-Adrenergic Receptor
Bac :	Bacténécines
BDNF :	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BMAPs :	Bovine Myéloïd Antimicrobial Peptides
CCL :	CC-Chimiokine Ligand
CDs :	Cellules Dendritiques
CGA :	ChromoGranine A
CGB :	ChromoGranine B
CGRP :	Calcitonine Gene Related Peptide
CJD :	Creutzfeldt-Jakob Disease
CK2 :	Caséine Kinase 2
CMH :	Complexe Majeur d’Histocompatibilité
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
CPAg :	Cellules Présentatrices d’Antigènes
CPE :	CarboxyPeptidase E
CpG :	Cytosine phosphate Guanine
CRF :	Corticotropin-Releasing Factor
CRH :	Corticotropin-Releasing Hormone
CRHR :	Corticotropin Releasing Hormone Receptor

CXCL :	CXC-Chimiokine Ligand
DBH :	Dopamine β -Hydroxylase
DTT :	DiThioThreitol
eCATHs :	equine Cathelicidine
ESI :	ElectroSpray Ionization
FAB :	Fast Atome Bombardment
GDP :	Guanosine DiPhosphate
GFP :	Green Fluorescent Protein
GlucR :	Glucagon Receptor
GMPc :	GMP cyclique
GGBP :	Guanine nucleotide binding protein
GnRH :	Gonadotropine Releasing Hormone
GTP :	Guanosine TriPhosphate
hBD :	human Beta Defensin
HHS :	Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien
HPLC :	High Performance Liquid Chromatography
IEF :	Isoélectrofocalisation
IFN- γ :	Interferon-gamma
IL :	InterLeukine
IP3 :	Inositol 3 Phosphate
IP3R :	Inositol 3 Phosphate Receptor
kDa :	Kilo Dalton
KO :	KnockOut
LC/MS :	Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry
LDCVs :	Large Dense Core Vesicles
LHR :	Luteinizing Hormone Receptor
LH β :	Luteinizing Hormone
LPS :	LipoPolySaccharide
MALDI-TOF :	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight
MHB :	Mueller-Hinton-Broth
MIC :	Minimal Inhibitory Concentration
MSH :	Melanocyte-Stimulating Hormone
ND :	Non Déterminé
NESP55 :	Neuroendocrine Secretory Protein 55

NFκB :	Nuclear Factor κB
NK :	Natural Killers
NLS :	Nuclear Localization Signal
NPY :	NeuroPeptide Y
PACAP :	Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide
PAF :	Platelet Activation Factor
PAM :	Peptidylglycine-α-Amidating Monooxygenase
PAMPs :	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PAMPs :	Pigs Myeloïd Antimicrobial Peptides
PAMs :	Peptides Antimicrobiens
PBS :	Phosphate Buffer Saline
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PCs :	Prohormone Convertases
PCSK2 :	Protein Convertase Subtilisin/Kexin type 2
PD2R :	Prostaglandin D2 receptor
PDB :	Potato Dextrose Broth
PEA :	ProEnképhaline A
PEBP :	PhosphatidylEthanolamine Binding Protein
PG :	PeptidoGlycane
pHi :	Ph Isolélectrique
PKA :	Protéine Kinase A
PKC :	Protéine Kinase C
PM :	Poids Moléculaires
PMN :	neutrophiles PolyMorphoNucléaires
PNMT :	Phényléthylamine N-Méthyl-Transférase,
PrP :	Prion Protein
PRR :	Pattern Recognition Receptor
PSG :	Protéines Solubles des Granules
PTH :	ParaThyroid Hormone
PTP :	Prohormone Thiol-Protéase
PVDF :	PolyVinylidine DiFluoride
RMN :	Résonnance Magnétique Nucléaire
SDS :	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE :	Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

SgII :	Sécrétogranine II
SgIII :	Sécrétogranine III
SgIV :	Sécrétogranine IV
SgV :	Sécrétogranine V
SgVI :	Sécrétogranine VI
SMAPs :	Sheep Myéloïd Antimicrobial Peptides
SN :	SécrétoNeurine
SNC :	Système Nerveux Central
SNP :	Système Nerveux Parasymphatique
SNS :	Système Nerveux Sympathique
SOD :	Superoxyde-Dismutase
TAP :	Tracheal Antimicrobial Peptide
TCA :	Acide TriChloroAcétique
TFA :	Acide TriFluoroAcétique
TLR :	Toll-Like Receptors
TNF :	Tumor-Necrosis Factor
TSH :	Thyroid-Stimulating Hormone
UDP:	Uridine Diphosphate
VAMP :	Vesicle-Associated Membrane Protein
VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VIP :	Vasoactive Intestinal Peptide

Figures

<i>Figure 1 : Vue antérieure des glandes surrénales</i>	- 5 -
<i>Figure 2 : Voie de la biosynthèse des catécholamines</i>	- 6 -
<i>Figure 3 : Innervation de la glande surrénale</i>	- 7 -
<i>Figure 4 : Embryologie des cellules chromaffines de la médullo-surrénale</i>	- 8 -
<i>Figure 5 : Cellule chromaffine</i>	- 9 -
<i>Figure 6 : Principaux mécanismes de l'immunité naturelle et adaptative</i>	- 14 -
<i>Figure 7 : Types d'immunité adaptative</i>	- 15 -
<i>Figure 8 : Le système lymphoïde</i>	- 16 -
<i>Figure 9 : Représentation schématique de la structure des membranes bactériennes</i>	- 19 -
<i>Figure 10 : L'immunité innée est nécessaire à la réponse immunitaire adaptative</i>	- 20 -
<i>Figure 11 : Illustration des connections entre le système immunitaire et le système nerveux</i>	- 24 -
<i>Figure 12 : Effet du système nerveux sur les cellules immunitaires et les organes lymphoïdes</i>	- 25 -
<i>Figure 13 : Effets des glucocorticoïdes sur les cellules immunitaires</i>	- 27 -
<i>Figure 14 : Organisation des cathélicidines sous forme de prépropeptides</i>	- 31 -
<i>Figure 15 : Représentation d'une molécule d'α défensine</i>	- 33 -
<i>Figure 16 : Représentation d'un dimère de β défensine humaine</i>	- 34 -
<i>Figure 17 : Rôles des peptides antimicrobiens</i>	- 35 -
<i>Figure 18 : Les cibles bactériennes des peptides antimicrobiens</i>	- 38 -
<i>Figure 19 : Effets des peptides antimicrobiens hBD-2 ou LL-37 sur les mastocytes</i>	- 40 -
<i>Figure 20 : Représentation des trois modèles principaux expliquant l'interaction des PAMs avec les membranes</i>	- 43 -
<i>Figure 21 : Représentation schématique du développement d'un biofilm sur une surface</i>	- 48 -
<i>Figure 22 : Homologie de séquence entre la CGA et la CGB bovine</i>	- 56 -
<i>Figure 23 : Alignement des séquences de CGA de bœuf, homme, rat et souris</i>	- 56 -
<i>Figure 24 : Localisation sur la séquence de la CGA des modifications post-traductionnelles et des peptides actifs</i>	- 58 -
<i>Figure 25 : Alignement des séquences de CGB de bœuf, homme, rat et souris</i>	- 59 -
<i>Figure 26 : Localisation sur la séquence de la CGB de ses modifications post-traductionnelles et de ses peptides actifs</i>	- 60 -

<i>Figure 27: Séquence de la vasostatine I bovine</i>	- 62 -
<i>Figure 28 : Séquence de la vasostatine II bovine</i>	- 62 -
<i>Figure 29 : Séquence de la chromacine bovine</i>	- 62 -
<i>Figure 30 : Séquence de la chromostatine bovine</i>	- 62 -
<i>Figure 31 : Séquence de la pancréastatine bovine</i>	- 63 -
<i>Figure 32 : Séquence du WE-14 bovin</i>	- 63 -
<i>Figure 33 : Séquence de la catestatine bovine</i>	- 64 -
<i>Figure 34 : Séquence de la parastatine bovine</i>	- 65 -
<i>Figure 35 : Séquence du GAWK humain</i>	- 66 -
<i>Figure 36 : Séquence du BAM-1745 bovin</i>	- 66 -
<i>Figure 37 : Séquence du CCB bovin</i>	- 66 -
<i>Figure 38 : Séquence de la sécrétolytine bovine</i>	- 67 -
<i>Figure 39 : Schéma des voies de sécrétion régulées et constitutives</i>	- 73 -
<i>Figure 40 : Alignement des séquences de SgII de bœuf, homme, rat et souris</i>	- 77 -
<i>Figure 41 : Caractérisation des peptides issus de la maturation protéolytique de la SgII par les prohormones convertases</i>	- 80 -
<i>Figure 42 : Localisation sur la séquence de la SgII des modifications post-traductionnelles et des peptides dérivés</i>	- 80 -
<i>Figure 43 : Séquence de la SN bovine</i>	- 82 -
<i>Figure 44 : Séquence du peptide EM-66 bovin</i>	- 83 -
<i>Figure 45 : Séquence de la mansérine bovine</i>	- 83 -
<i>Figure 46 : Séquence du peptide AMENM bovin</i>	- 84 -
<i>Figure 47 : Localisation sur la séquence de la CGB des modifications post-traductionnelles connues, des sites dibasiques et des peptides dérivés</i>	- 86 -
<i>Figure 48 : Séquence de la SgII bovine</i>	- 108 -
<i>Figure 49 : Stratégie expérimentale</i>	- 109 -
<i>Figure 50 : Immunodétection anti sécrétoneurine réalisée sur une membrane de nitrocellulose issue du transfert d'une électrophorèse bidimensionnelle de protéines solubles de granules chromaffines de la médullo-surrénale bovine</i>	- 110 -
<i>Figure 51 : Visualisation de l'emplacement théorique des fragments issus de la dégradation protéolytique de la sécrétogranine II bovine</i>	- 113 -
<i>Figure 52 : Représentation des fragments possibles issus de la maturation de la SgII bovine</i>	- 114 -

<i>Figure 53 : Localisation des modifications post-traductionnelles potentielles de la sécrétogranine II bovine</i>	- 118 -
<i>Figure 54 : Séparation par chromatographie d'exclusion Sephadex G75.</i>	- 123 -
<i>Figure 55 : Séparation HPLC des fractions obtenues par chromatographie d'exclusion</i>	- 123 -
<i>Figure 56 : Alignement des séquences de la SgII connues</i>	- 124 -
<i>Figure 57 : Arbre phylogénétique des formes connues de la sécrétogranine II</i>	- 125 -
<i>Figure 58 : Séquence de la sécrétogranine II bovine</i>	- 127 -
<i>Figure 59 : Pourcentages de lyses d'érythrocytes de rat incubés avec 100µM de peptides à activité antimicrobienne</i>	- 128 -
<i>Figure 60 : Analyse de l'interaction des peptides synthétiques AE et CE marqués à l'orange 548 avec le champignon filamenteux N. crassa</i>	- 130 -
<i>Figure 61 : Similarité de séquence entre les peptides synthétiques AE et CE dérivés de la sécrétogranine II bovine et les différents peptides antimicrobiens connus</i>	- 131 -
<i>Figure 62 : Schéma du principe du MALDI-TOF</i>	- 164 -

Tableaux

<i>Tableau I : Composition de la matrice d'un granule de sécrétion d'une cellule chromaffine</i>	- 10 -
<i>Tableau II : Effets cardiovasculaires et métaboliques de l'adrénaline et de la noradrénaline</i>	- 11 -
<i>Tableau III : Différences entre l'immunité innée et adaptative</i>	- 13 -
<i>Tableau IV : Les acteurs de l'immunité innée</i>	- 17 -
<i>Tableau V : Interaction entre les facteurs neuronaux et endocrines et les acteurs de l'immunité innée</i>	- 29 -
<i>Tableau VI : Comparaison de la localisation tissulaire de la CGA, CGB et SgII</i>	- 51 -
<i>Tableau VII : Distribution des chromogranines dans les cellules chromaffines de différentes espèces</i>	- 52 -
<i>Tableau VIII : Propriétés physico-chimiques des chromogranines/sécrétogranines</i>	- 55 -
<i>Tableau IX : Pourcentage d'homologie entre la séquence des différents peptides de CGA par rapport à la séquence de bœuf</i>	- 60 -
<i>Tableau X : Pourcentage d'homologie de séquence entre les différents peptides actifs de la CGB</i>	- 65 -
<i>Tableau XI : Pourcentage d'homologie entre la séquence des différents peptides de SgII par rapport à la séquence de bœuf</i>	- 81 -
<i>Tableau XII : Quantification des spots détectés dans la Figure 50</i>	- 112 -
<i>Tableau XIII : Points isoélectriques et masses moléculaires mesurés pour les spots détectés sur le film d'immunodétection</i>	- 113 -
<i>Tableau XIV : Liste des points de clivage détectés, ainsi que les liaisons dans lesquelles ils sont impliqués</i>	- 115 -
<i>Tableau XV : Bilan des sites possibles de modifications post-traductionnelles de la SgII</i>	- 116 -
<i>Tableau XVI : Comparaison des pI et MW des peptides issus de la maturation de la SgII, choisis pour leur aptitude à être modifiés</i>	- 119 -
<i>Tableau XVII : Démarches expérimentales</i>	- 121 -
<i>Tableau XVIII : Tableau récapitulatif du pourcentage d'homologie entre les différentes séquences protéiques connues de la SgII</i>	- 126 -
<i>Tableau XIX : Pourcentage d'homologie entre les séquences humaines et bovines des peptides choisis</i>	- 126 -

<i>Tableau XX : Bilan des activités antimicrobiennes des peptides synthétiques entiers et coupés par l'endoprotéase Glu C</i>	- 128 -
<i>Tableau XXI : Volumes de tampon d'équilibration en fonction de la taille des bandelettes de gel.</i>	- 159 -
<i>Tableau XXII : Conditions de réhydratation.</i>	- 159 -
<i>Tableau XXIII : Condition d'utilisation des anticorps lors des Western blot</i>	- 162 -

Introduction

Les recherches présentées dans cette thèse ont été réalisées sous la direction du Dr. Marie-Hélène Metz-Boutigue, au sein de l'équipe de *Neuropeptides Bioactifs* dans l'unité INSERM 575 de *Physiopathologie du Système Nerveux* (Dir. Dr. Dominique Aunis), qui s'intègre dans le cadre de l'IFR37 des Neurosciences de Strasbourg.

Les systèmes nerveux, endocrinien et immunitaire agissent en synergie afin d'assurer le maintien de l'homéostasie. Depuis quelques années, il est apparu évident que le système immunitaire n'était pas indépendant, mais sous le contrôle des deux autres systèmes, tout en les régulant. Les cellules chromaffines se situent à l'interface entre ces différents systèmes. En effet, leurs granules de sécrétions constituent les organelles de stockage des catécholamines, et contiennent également des neuropeptides et des protéines dont les chromogranines (Laslop et coll., 2002). Notre équipe recherche et caractérise les peptides libérés par les cellules chromaffines de la médullo-surrénale dans les états de stress. Les peptides dérivés de la maturation intragranulaire des chromogranines sont capables de moduler les activités des systèmes nerveux, endocrines et immunitaires (Metz-Boutigue et coll., 1993 ; Strub et coll., 1995 et Goumon et coll., 2000).

La découverte de peptides antibactériens et antifongiques, dans les granules de sécrétions des cellules chromaffines de la médullo-surrénale et dans les sécrétions de cellules immunitaires telles que les neutrophiles polymorphonucléaires (PMN), établit un lien entre les systèmes neuroendocrine et immunitaire, orientant la thématique du laboratoire vers le concept de Neuroimmunité (Strub et coll., 1996a ; Goumon et coll., 1998 ; Metz-Boutigue et coll., 1998 ; Lugardon et coll., 2000 ; Lugardon et coll., 2001 ; Metz-Boutigue et coll., 2003a et Metz-Boutigue et coll., 2003b). Les recherches réalisées au sein de l'équipe du Dr. Marie-Hélène Metz-Boutigue visent à démontrer l'importance des peptides dérivés des chromogranines, de la proenképhaline-A (PEA) et de l'ubiquitine en tant que facteurs de l'immunité innée. Dans les situations de stress psychologique ou physique, la mobilisation de l'axe hypothalamo-hypophyso-surrénalien et de la voie sympathique périphérique va provoquer la libération dans la circulation sanguine, avec les catécholamines, des peptides dérivés des chromogranines (Metz-Boutigue et coll., 1993 et Strub et coll., 1995).

Afin de comprendre les rôles *in vivo* de ces peptides, ils ont été recherchés dans de nombreux fluides biologiques impliqués dans les mécanismes de défense (sécrétions de neutrophiles polymorphonucléaires, liquides infectieux, liquide céphalo-rachidien). Les

travaux effectués sur ces peptides ont mis en évidence la modulation des activités antimicrobiennes par les facteurs structuraux comme la longueur de la chaîne polypeptidique et la présence de modifications post-traductionnelles. Celles-ci sont spécifiques du tissu et de l'organisme étudié. Ainsi, l'expression des activités antimicrobiennes est directement reliée à l'état physiologique (âge, maladie, environnement...).

Les travaux que j'ai entrepris durant mes années de thèses, ont permis de faire la lumière sur les modifications post-traductionnelles de la CGB. Je me suis également focalisée sur une granine moins abondante la SgII dont j'ai débuté la caractérisation de la maturation. J'ai recherché si cette protéine, de même que la CGA et la CGB, pouvait être le précurseur de peptides à activité antimicrobienne. Enfin, mon dernier axe de recherche a été de mettre en évidence une application thérapeutique possible des peptides antimicrobiens dans la lutte contre les candidoses orales.

Afin de préciser l'environnement scientifique dans lequel s'inscrivent mes recherches, je présente le contexte de mes travaux dans la partie *Données Bibliographiques* qui est subdivisée en quatre chapitres. Le **chapitre I** présente notre modèle d'étude : la glande surrénale. Dans le **chapitre II** je présente l'immunité ainsi que les liens existants entre le système nerveux et les acteurs de l'immunité. Le **chapitre III** permet de découvrir les peptides antimicrobiens, des acteurs importants dans l'immunité innée, par des actions directes et indirecte sur les pathogènes. Enfin, dans le **chapitre IV** je présente les chromogranines, protéines majoritaires des granules de sécrétions des cellules chromaffines et précurseurs de nombreux peptides actifs parmi lesquels se retrouvent des peptides antimicrobiens.

Les résultats de mes études sont présentés dans la partie intitulée *Résultats Expérimentaux* qui comporte quatre chapitres. Dans le **chapitre I**, je présente les expériences relatives à la caractérisation des modifications post-traductionnelles de la CGB. Dans le **chapitre II** je m'intéresse à la SgII pour laquelle je présente la caractérisation de sa maturation. Cette maturation peut donner naissance à des peptides antimicrobiens présentés dans le **chapitre III**. Enfin, le **chapitre IV** fait la lumière sur une application possible d'un peptide antifongique dérivé de la CGA (la chromofungine) dans la lutte contre les candidoses orales sous-prothétiques.

Les techniques de protéomique et de microbiologie nécessaires à ces recherches sont présentées dans la partie *Matériels et Méthodes* et les références bibliographiques sont regroupées par ordre alphabétique dans la partie *Références Bibliographiques*. Dans une

ultime partie *Liste des Publications*, les publications et communications qui ont été présentées en relation avec ce travail de thèse sont indiquées.

Données bibliographiques

L'incidence du stress sur les réponses du système immunitaire fait l'objet de très nombreuses études qui intègrent le domaine de la neuroimmunologie avec la communication bi-directionnelle entre les systèmes neuroendocrine et immunitaire. Dans ce contexte, le rôle physiologique de la glande surrénale suscite l'intérêt de nombreux chercheurs par son caractère multi-fonctionnel. La partie médullaire de la surrénale est constituée presque exclusivement de cellules chromaffines, qui constituent un modèle d'étude privilégié pour l'étude de la communication entre les systèmes neuroendocrine et immunitaire. Lors des états de stress les cellules chromaffines, qui sont stimulées par les fibres nerveuses sympathiques et par l'axe endocrine HHS, sécrètent avec la décharge massive de catécholamines de nombreux neuropeptides, enzymes et protéines. Parmi les peptides libérés notre équipe a mis en évidence la présence de peptides antimicrobiens provenant majoritairement de la maturation protéolytique naturelle des chromogranines. Ces peptides d'origine neuroendocrine sont des acteurs importants du système immunitaire, agissant directement sur les microorganismes et médiant les effets du système immunitaire adaptatif.

Les recherches présentées dans ma thèse intègrent à la fois de nouvelles données de l'immunité innée et des caractéristiques structurales et biologiques novatrices des chromogranines. Dans la partie introductive de ce manuscrit intitulée Données Bibliographiques je présente une revue détaillée et actualisée de ces deux domaines de recherche.

Chapitre I : Les cellules chromaffines de la glande surrénale : notre modèle d'étude

I- Les glandes surrénales

Les glandes surrénales sont localisées en position rétro-péritonéale, annexées à la face antérieure du pôle supérieur des reins (Figure 1). Située au niveau de la 12^{ème} vertèbre dorsale, la glande surrénale droite a une forme triangulaire. La glande surrénale gauche, plus antérieure par rapport au rein, est en forme de demi-lune. Le volume des glandes surrénales varie en fonction de l'âge et de l'état physiologique, elles pèsent en moyenne 7 à 8 grammes.

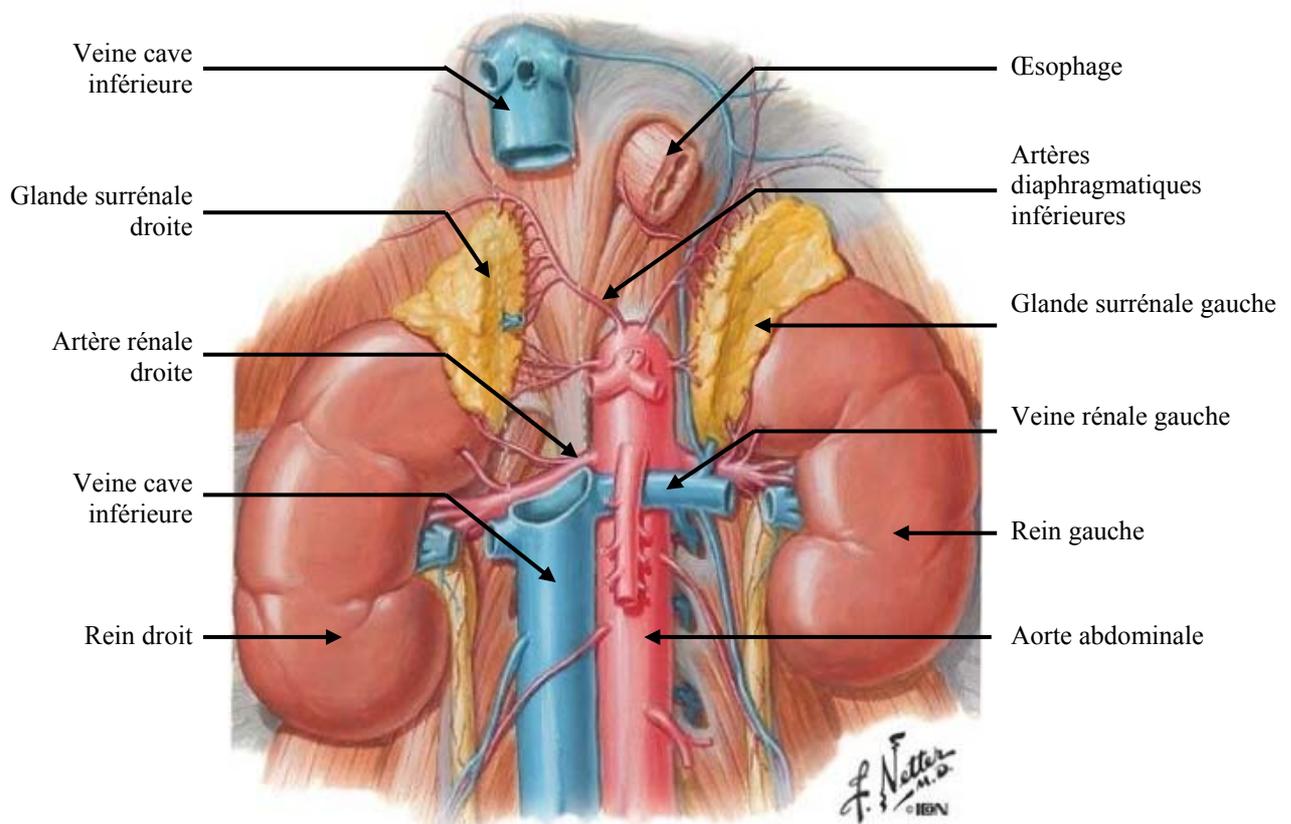


Figure 1 : Vue antérieure des glandes surrénales (<http://www.netterimages.com/>)

Les glandes surrénales, situées au niveau du pôle supérieur des reins, sont irriguées par les artères diaphragmatiques inférieures, branches artérielles directement issues de l'aorte abdominale. Les cellules chromaffines sécrètent les neurotransmetteurs directement dans les capillaires de la medulla

Les glandes surrénales se divisent en deux parties endocrines distinctes, tant au niveau fonctionnel qu'au niveau embryologique :

- la corticosurrénale, d'origine mésodermique, sécrète des glucocorticoïdes (cortisol), des minéralocorticoïdes (aldostérone), des androgènes et des œstrogènes. Elle est située à la périphérie de la glande et représente 80 à 90 % de son poids (Kreiner, 1982).
- la médullo-surrénale, au centre de la glande, est d'origine neuroectodermique. Elle est composée de cellules chromaffines. C'est au sein de ces cellules que sont synthétisés et stockés les catécholamines (dopamine, noradrénaline, adrénaline) (Figure 2), qui sont ensuite sécrétées dans la circulation sanguine.

L'innervation de la glande surrénale est assurée par le système sympathique *via* le nerf splanchnique (Figure 3). Les cellules chromaffines de la médullo-surrénale synthétisent de la noradrénaline. Cependant, sous l'action de la Phényléthylamine N-Méthyl-Transférase (PNMT), ces cellules sont converties en cellules sécrétrices d'adrénaline. L'induction de la PNMT est déclenchée par les glucocorticoïdes sécrétés par la corticosurrénale (Kalcheim et coll., 2002).

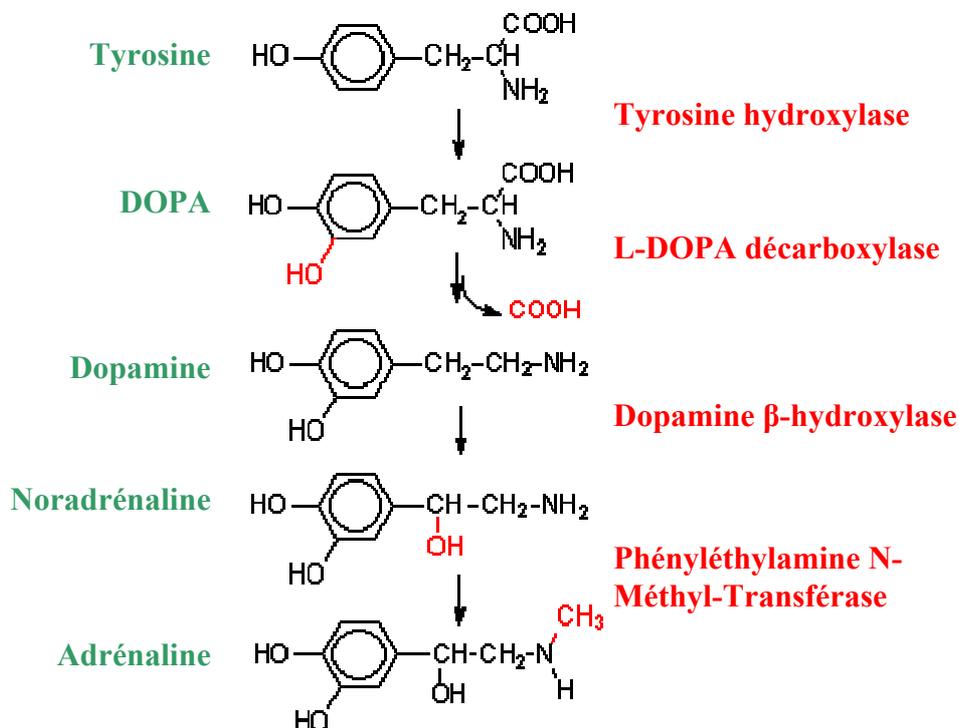


Figure 2 : Voie de la biosynthèse des catécholamines

La synthèse de la noradrénaline a lieu dans les granules de sécrétions, sous l'action de la DBH. La synthèse d'adrénaline ne se produit que dans les cellules adrénergiques, possédant la PNMT

Les cellules chromaffines

La médullo-surrénale est constituée de cordons de grandes cellules polyédriques (les cellules chromaffines), entre lesquelles circulent des capillaires sanguins fenêtrés, entourés d'un fin réseau conjonctif. Les cellules chromaffines sont innervées par des fibres sympathiques préganglionnaires (Figure 3). D'un point de vue embryologique, les cellules chromaffines sont issues des mêmes cellules de la crête neurale que les neurones sympathiques adrénérgiques (Figure 4). Ces cellules migrent au niveau ventral et s'agrègent au niveau de l'aorte dorsale (Le Douarin et coll., 1999).

Les cellules de la crête neurale se différencient en cellules progénitrices neuronales catécholinergiques contenant la tyrosine hydroxylase (Reissmann et coll., 1996 et Shah et coll., 1996). Soit ces cellules migrent jusqu'au niveau des ganglions sympathiques de la médullo-surrénale, soit elles constituent des groupes cellulaires chromaffines extra-médullaires, retrouvés essentiellement au niveau de l'espace péritonéal, il s'agit des cellules entérochromaffines. Les cellules initialement multipotentes de la crête neurale migrent à partir de l'apex de la crête neurale. Certaines cellules forment les ganglions sympathiques, tandis que d'autres colonisent les glandes surrénales pour former leur partie médullaire

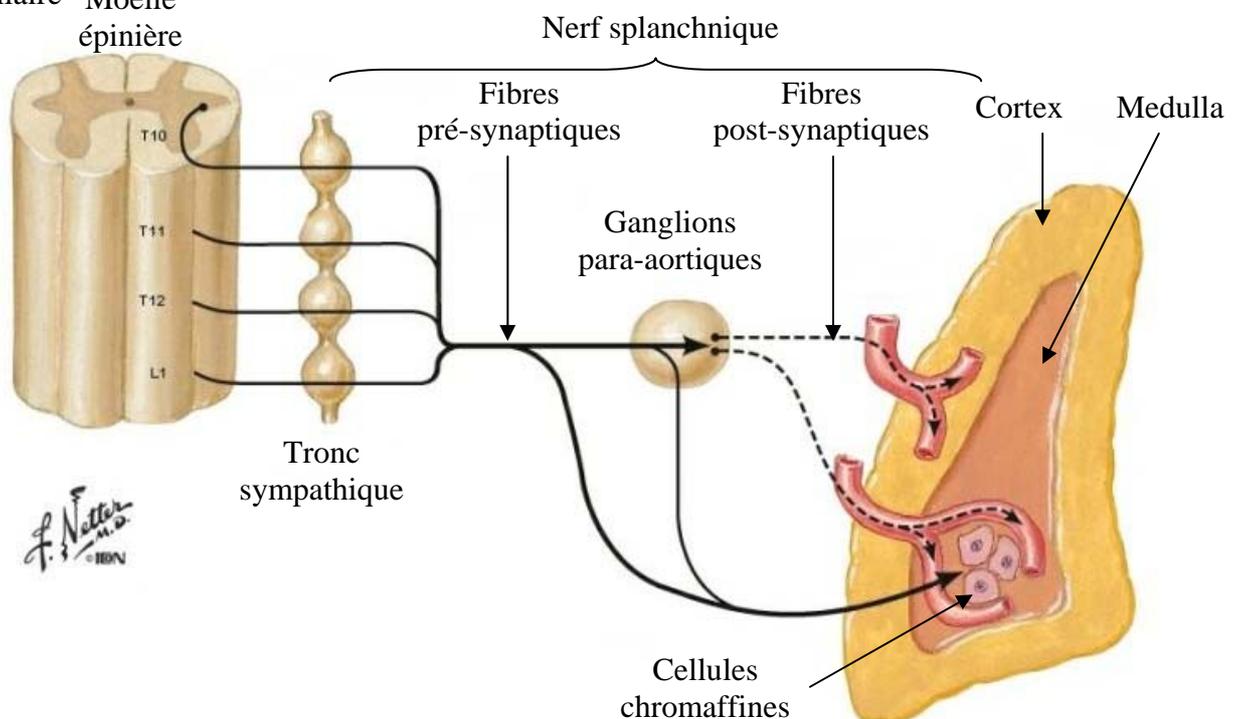


Figure 3 : Innervation de la glande surrénale (<http://www.netterimages.com/>)

Ce sont les fibres nerveuses du nerf splanchnique qui innervent directement la région médullaire de la glande

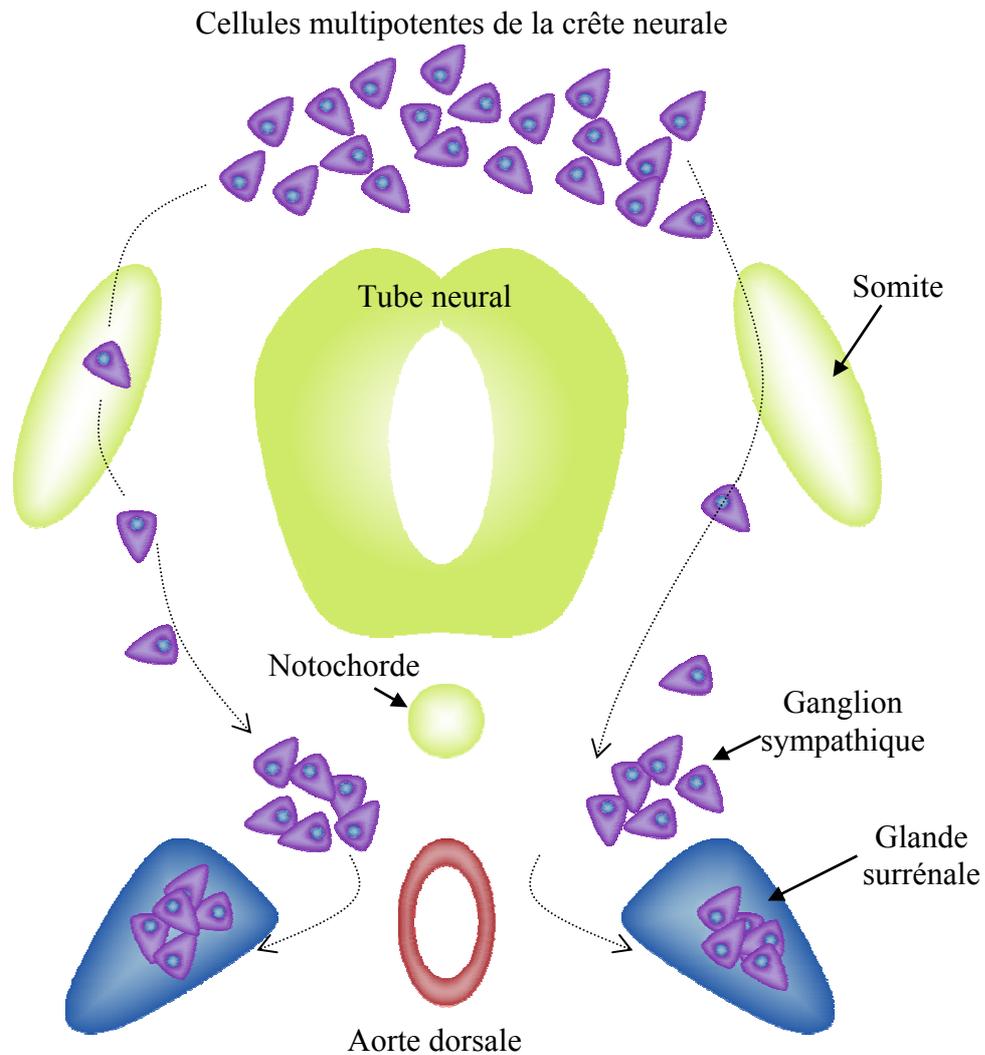


Figure 4 : Embryologie des cellules chromaffines de la médullo-surrénale

Les cellules chromaffines sont nommées ainsi du fait de la coloration brune acquise en présence de bichromate de potassium. Leur cytoplasme contient un grand nombre de granules de sécrétion (Figure 5) qui renferment les catécholamines ; 80 % des cellules chromaffines contiennent de l'adrénaline, 16 % de la noradrénaline et 4 % de la dopamine. Les cellules chromaffines sont polarisées, comme l'indique leur disposition et leur ultrastructure. Leur pôle apical est en contact avec les terminaisons nerveuses du nerf splanchnique, tandis que leur pôle basal est relié aux cellules épithéliales. Les jonctions entre les cellules chromaffines sont assurées par des desmosomes situés sur leurs faces latérales. Le contenu des granules est libéré dans l'espace existant entre les cellules chromaffines et les cellules épithéliales, pour atteindre la circulation sanguine (Figure 5).

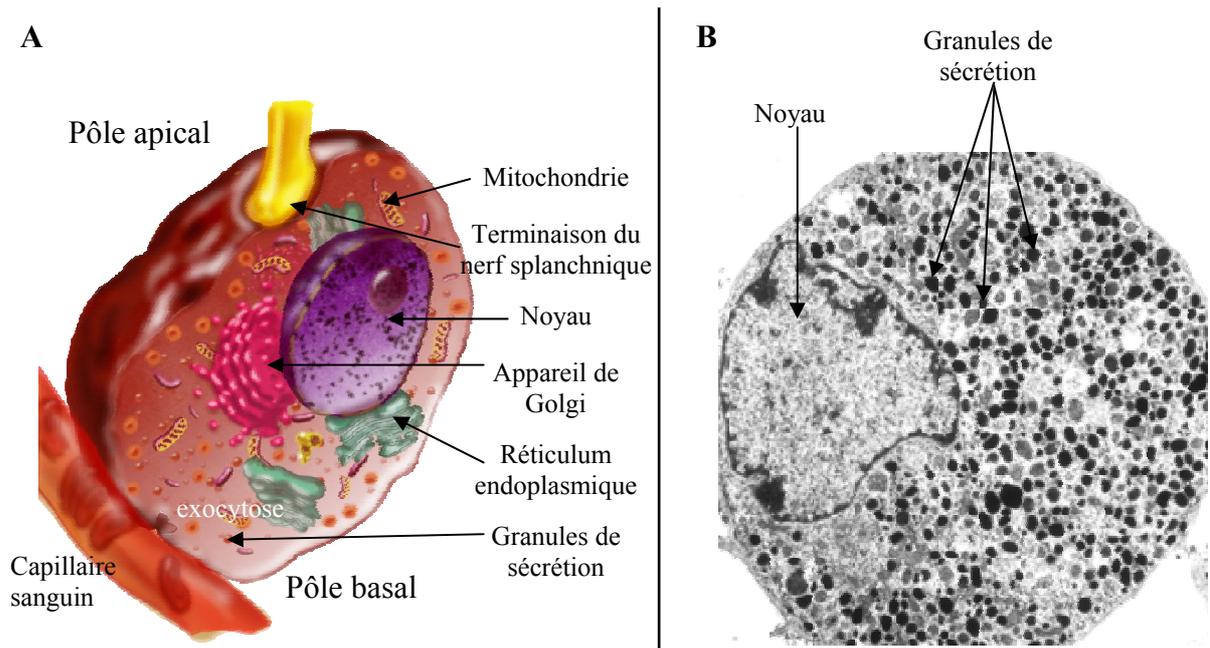


Figure 5 : Cellule chromaffine

A : Représentation schématique d'une cellule chromaffine. B : Image en microscopie électronique d'une cellule chromaffine (Aunis et coll., 1981).

Les granules de sécrétion sont stockés en grand nombre dans le cytoplasme, leur contenu est libéré au niveau du pôle basal suite à une stimulation du nerf splanchnique dont les fibres sont en contact avec le pôle apical

III- Les granules de sécrétion

En 1975, il a été montré que le contenu intragranulaire pouvait être libéré par les faces latérales des cellules chromaffines, permettant ainsi une régulation paracrine ou autocrine entre ces cellules (Grynspan-Winogard, 1975). Les granules de sécrétion sont similaires aux Large Dense Core Vesicles (LDCVs) des neurones. La composition des granules de sécrétion est présentée dans le Tableau I. Les granules de sécrétion des cellules chromaffines, permettent le stockage des catécholamines (0,5 -0,6 M d'adrénaline et de noradrénaline) dans un environnement de pH acide (pH 5,5). Ces granules contiennent également d'autres espèces moléculaires telles que des nucléotides, des peptides, des protéines, des sels, des enzymes et des cofacteurs (Tableau I) (Sen et coll., 1980 et Laslop et coll., 2002).

Tableau I : Composition de la matrice d'un granule de sécrétion d'une cellule chromaffine

Catécholamines	Adrénaline, Noradrénaline, Dopamine, dérivés du 3-Amino-2-Phénylpropène
Nucléotides	ATP, ADP, AMP, GTP, GDP, UDP
Enzymes	DBH (Dopamine Beta Hydroxylase), Enképhalinase, Acétylcholinestérase, PCs (Prohormone Convertases), PTP (Prohormone Thiol-Protéase), AGE (Adrenorphin-Generating Enzyme), ACE (Angiotensin-Converting Enzyme), PAM (Peptidylglycine- α -Amidating Monooxygenase), Carboxypeptidase H/E, Endopine 1 et 2
Cofacteurs	Acide Ascorbique (22 mM) (cofacteur de la DBH)
Ions	Ca ²⁺ (25-40 mM), Mg ²⁺ , Na ⁺ , PO ₄ ²⁻
Peptides	Neuropeptide Y, Substance P, VIP (Vasoactive Intestinal Peptide), PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide), Enképhalines, Somatostatine, Neurotensine, Dynorphine, Galanine, ANP (Atrial Natriuretic Factor), CRH (Corticotropin-Releasing Hormone) et ACTH (AdrenoCorticoTropin Hormone), Heparin-Binding EpidermalGrowth Factor-like Growth Factor
Protéines	Chromogranines / Sécrétogranines, Proenképhaline A, PhosphatidylEthanolamine Binding Protein (PEBP), Ubiquitine, Protéines Alpha 1-antichymotrypsin-like I et II

Les protéines majoritairement présentes dans les granules de sécrétion des cellules chromaffines sont les chromogranines. C'est une famille de protéines hydrophiles, acides et thermostables. Les membres les plus étudiés de cette famille sont les chromogranines A et B (CGA, CGB) par rapport aux sécrétogranines II, III, IV, V et VI (SgII, SgIII, SgIV, SgV, SgVI). Les chromogranines sont des précurseurs de peptides biologiquement actifs retrouvés dans les granules de sécrétion.

Parce qu'elles synthétisent, stockent et sécrètent des amines et des peptides, les cellules chromaffines possèdent des similarités fonctionnelles avec les neurones (périphériques et centraux) et les cellules endocrines. De plus, il est facile d'isoler de grandes quantités de cellules chromaffines. C'est pourquoi les cellules chromaffines constituent un modèle d'étude pour l'analyse des mécanismes mis en jeu lors de l'exocytose (Tischler, 2002). L'exocytose des granules de sécrétion met en jeu des mécanismes dépendants du calcium, qui font intervenir des protéines du complexe SNARE, associés à la membrane

plasmique (syntaxine-1, SNAP-25) et des protéines SNARE intégrées à la membrane des granules de sécrétion (VAMP-2, synaptotagmines) (Wassenberg et coll., 2002).

IV- Implication des cellules chromaffines lors des états de stress

L'adrénaline et la noradrénaline, libérées suite à un stress dans la circulation sanguine, se lient à différents récepteurs membranaires situés dans tout l'organisme (Tableau II).

Tableau II : Effets cardiovasculaires et métaboliques de l'adrénaline et de la noradrénaline

Effets cardiovasculaires	Récepteurs	Tissus
Vasoconstriction	α	Reins, peau, tissu conjonctif, muqueuses
Vasodilatation	β	Coronaires, muscles squelettiques
Augmentation de la force et de la fréquence cardiaque	β_1	Cœur
Effets métaboliques	Récepteurs	Tissus
Glycogénolyse	α, β	Foie, muscles squelettiques
Néoglucogenèse	α, β	Foie
Augmentation de la sécrétion de glucagon	β	Pancréas
Diminution de la sécrétion d'insuline	α	Pancréas
Lipolyse	β_1	Tissu adipeux

Les effets physiologiques résultant de la libération du contenu des granules de sécrétion des cellules chromaffines dans la circulation sanguine sont fonction de la nature des récepteurs adrénergiques et noradrénergiques mis en jeu. Les effets principaux se manifestent aux niveaux cardiovasculaire et métabolique. Lorsque les catécholamines se lient aux récepteurs α des vaisseaux sanguins, l'effet est vasoconstricteur, et lorsqu'elles se lient aux récepteurs β l'effet est vasodilatateur. Au niveau du cœur, la fixation aux récepteurs β_1 augmente la fréquence et le débit cardiaque (Guimarães et coll., 2001 et Wallukat, 2002). L'effet hypertensif s'explique par la combinaison de l'effet cardiaque et de l'effet vasoconstricteur. Au niveau métabolique, la sécrétion des catécholamines entraîne des effets à la fois lipolytiques, et une hyperglycémie due à l'augmentation de la glycogénolyse et de la néoglucogenèse (Nonogaki, 2000 et Collins et coll., 2001).

Lors d'un état de stress, de nombreux peptides sont sécrétés avec les catécholamines (Tableau I). Dans le cadre de ma thèse, je m'intéresse plus particulièrement aux peptides dérivés des chromogranines, certains de ces peptides, que nous présenterons dans une dernière partie, sécrétés lors de la stimulation de l'axe Hypothalamo-Hypophysio-Surrénalien (HHS) dans les états de stress, jouent des rôles dans l'immunité innée en tant que peptides antimicrobiens. Pour cette raison, dans la partie introduction de ma thèse, je présenterais une première partie sur les facteurs moléculaires et cellulaires de l'immunité.

Chapitre II : Relations entre système nerveux et système immunitaire

I- Les facteurs de l'immunité

1- Introduction

L'immunité se définit comme la résistance aux maladies, et notamment aux maladies infectieuses. La fonction physiologique du système immunitaire est de prévenir les infections et d'éradiquer les infections déclarées.

Les mécanismes de défense de l'hôte se composent d'une immunité naturelle, responsable de la protection initiale contre les infections, et de l'immunité adaptative, qui se développe plus lentement et met en œuvre une défense tardive et plus efficace contre les infections (Figure 6). Les mécanismes de l'immunité naturelle fournissent la défense initiale contre l'infection. Certains des mécanismes empêchent les infections (barrière épithéliale), tandis que d'autres éliminent les microorganismes (phagocytes, cellules NK, système du complément). Les réponses immunitaires adaptatives se développent plus tardivement et sont assurées par les lymphocytes et leurs produits. Les anticorps bloquent les infections et éliminent les microorganismes, et les lymphocytes T éliminent les pathogènes intracellulaires.

Il est habituel de distinguer, de manière, un peu dogmatique, l'immunité *innée* de l'immunité *adaptative* (Tableau III).

Tableau III : Différences entre l'immunité innée et adaptative

Immunité innée	Immunité adaptative
Nombre important de cellules capables d'attaquer le pathogène ¹	Nombre très faible de cellules spécifiques du pathogène ¹
Immédiate	Retardée
N'est pas spécifique d'un antigène	Est spécifique d'antigènes
Pas de mémoire immunitaire	Mémoire immunitaire
Pas de différence entre réponse primaire et secondaire	Réponse secondaire plus rapide et plus efficace

¹ Cellules disponibles avant l'entrée du pathogène

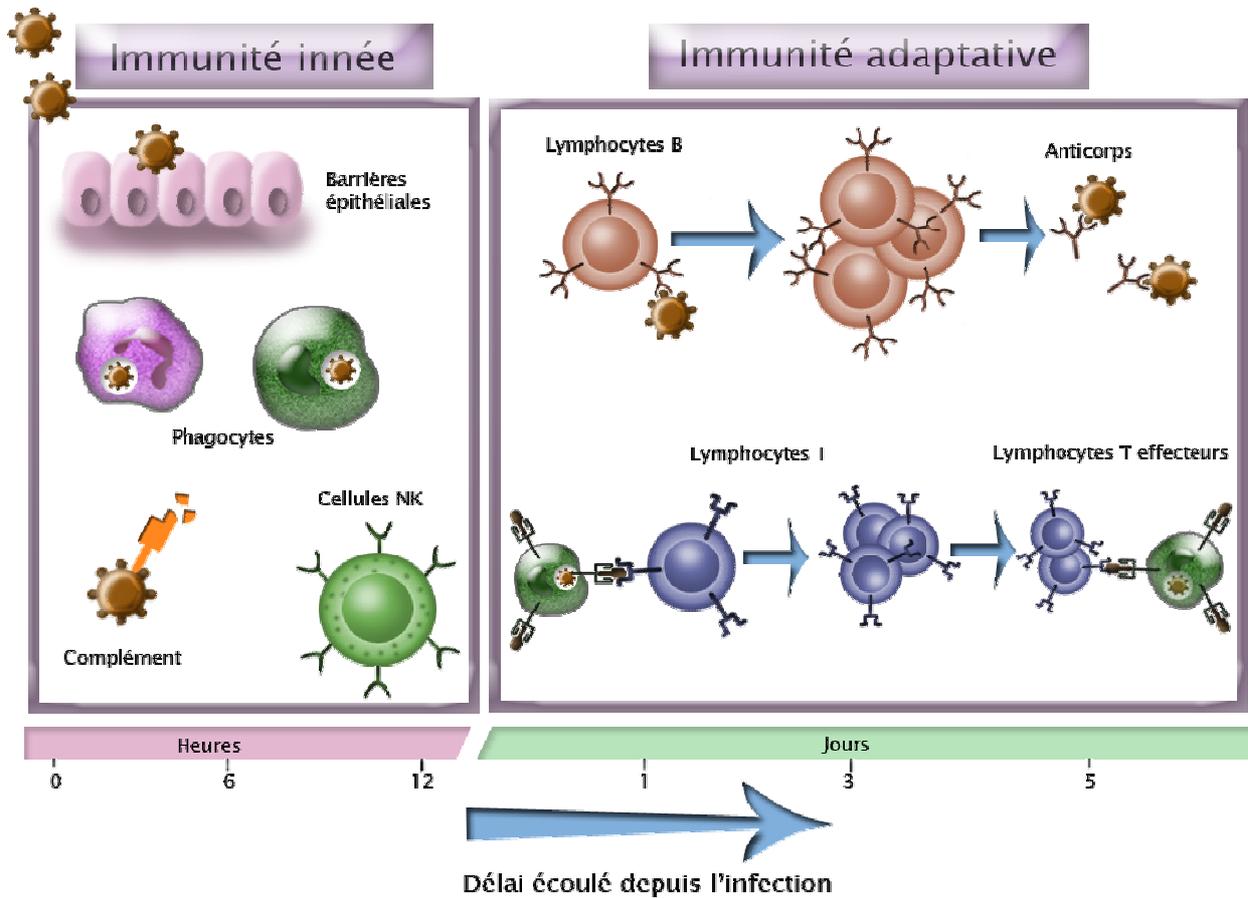


Figure 6 : Principaux mécanismes de l'immunité naturelle et adaptative

Les cinétiques des réponses immunitaires innées et adaptatives sont des approximations et peuvent varier en fonction des infections

2- L'immunité adaptative

L'immunité adaptative (ou acquise) est une défense stimulée par les microorganismes qui envahissent les tissus, c'est-à-dire qu'elle s'adapte à la présence des microorganismes invasifs. Il existe deux types d'immunité adaptative, appelés *immunité humorale* et *immunité à médiation cellulaire*, qui font intervenir différentes cellules et molécules, et sont destinés à opposer une défense respectivement aux pathogènes extracellulaires et intracellulaires (Figure 7).

La réponse humorale est basée sur la production de molécules effectrices appelées immunoglobulines, ou anticorps, et produites par les plasmocytes, qui résultent de la différenciation des lymphocytes B.

La réponse cellulaire est basée sur l'action des lymphocytes T qui coordonnent les différents volets de la réponse immunitaire et détruisent les cellules infectées ou cancéreuses. La mise en jeu de ces différentes cellules nécessite une organisation spatiale et temporelle particulière. Cette organisation implique des organes spécialisés dans la maturation des

lymphocytes (les organes lymphoïdes primaires), des organes spécialisées dans la rencontre entre les lymphocytes et leurs antigènes (les organes lymphoïdes secondaires) (Figure 8), des cellules spécialisées dans la présentation des antigènes aux lymphocytes (les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles ou CPAg) et enfin une recirculation efficace des lymphocytes dans l'ensemble des tissus (Castex, 2003).

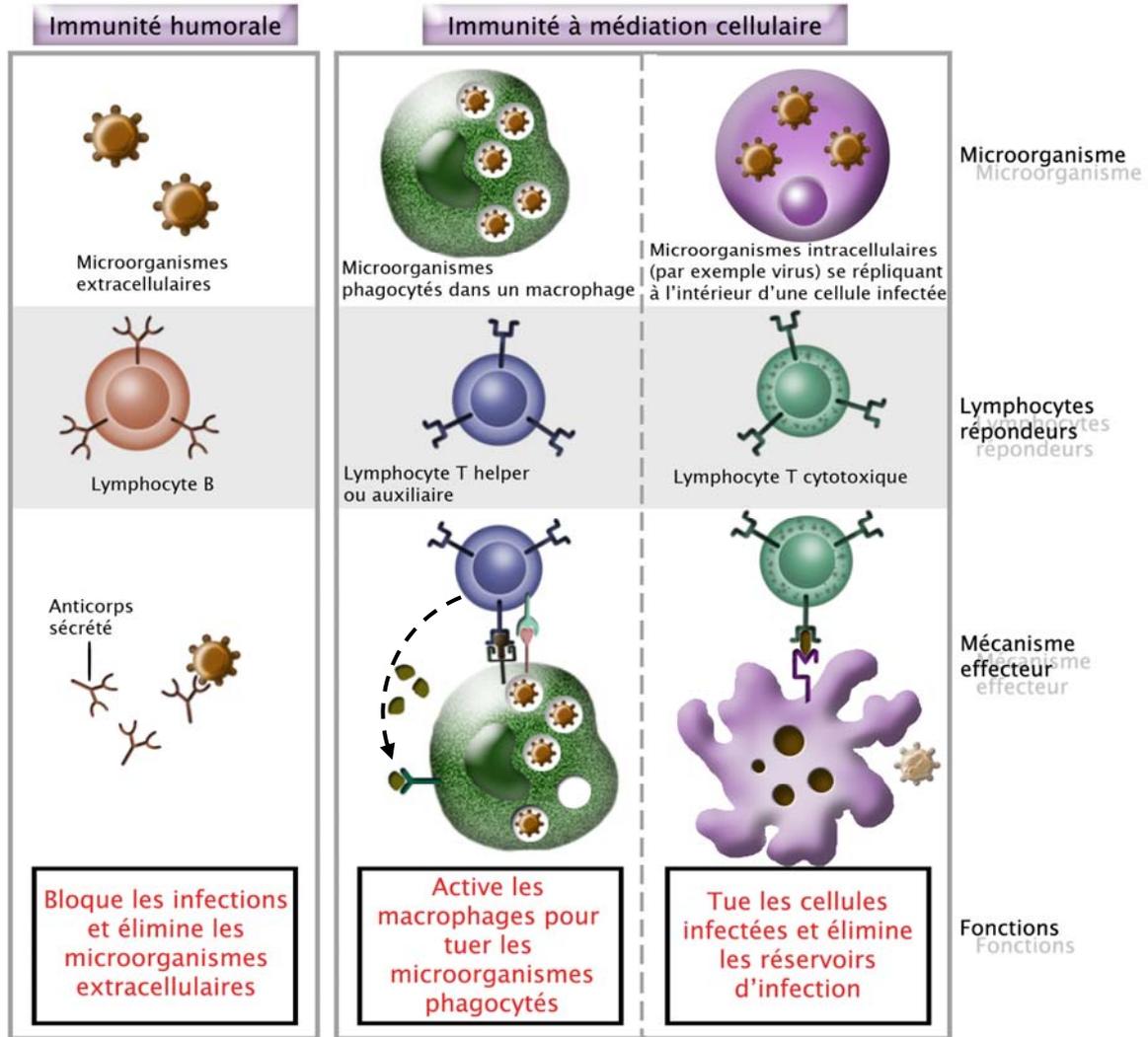


Figure 7 : Types d'immunité adaptative

L'immunité adaptative présente deux volets, l'immunité humorale et l'immunité à médiation cellulaire, chaque volet mettant en jeu ses propres effecteurs

Les réponses humorales et cellulaires sont étroitement liées l'une à l'autre par des mécanismes de régulation et de coopération cellulaire. La réponse adaptative est différente selon qu'il s'agisse d'une primo-infection ou d'une réinfection. La réponse immunitaire est initiée lors de la rencontre d'un individu avec une substance étrangère, généralement un microorganisme. Les réponses immunitaires sont composées de plusieurs phases

consécutives : reconnaissance de l'antigène, activation des lymphocytes, élimination de l'antigène, déclin et mémoire.

Le développement d'une immunité adaptative vis-à-vis d'un (ou plusieurs) antigène(s) découle de la reconnaissance de celui (ceux)-ci par des lymphocytes B ou T, dotés de récepteurs spécialisés, interaction qui entraîne leur prolifération et leur différenciation en lymphocytes B et T effecteurs (Figure 7). Dans le cas des lymphocytes T, l'étape de reconnaissance implique également des cellules présentatrices et plus particulièrement les cellules dendritiques, qui présentent aux lymphocytes T des peptides antigéniques associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I ou de classe II (CMH-I ou CMH-II) exprimées à leur surface (Castex, 2003).

Les propriétés les plus importantes de l'immunité adaptative sont une spécificité très prononcée pour des antigènes structurellement distincts et la mémoire d'une exposition antérieure à l'ant

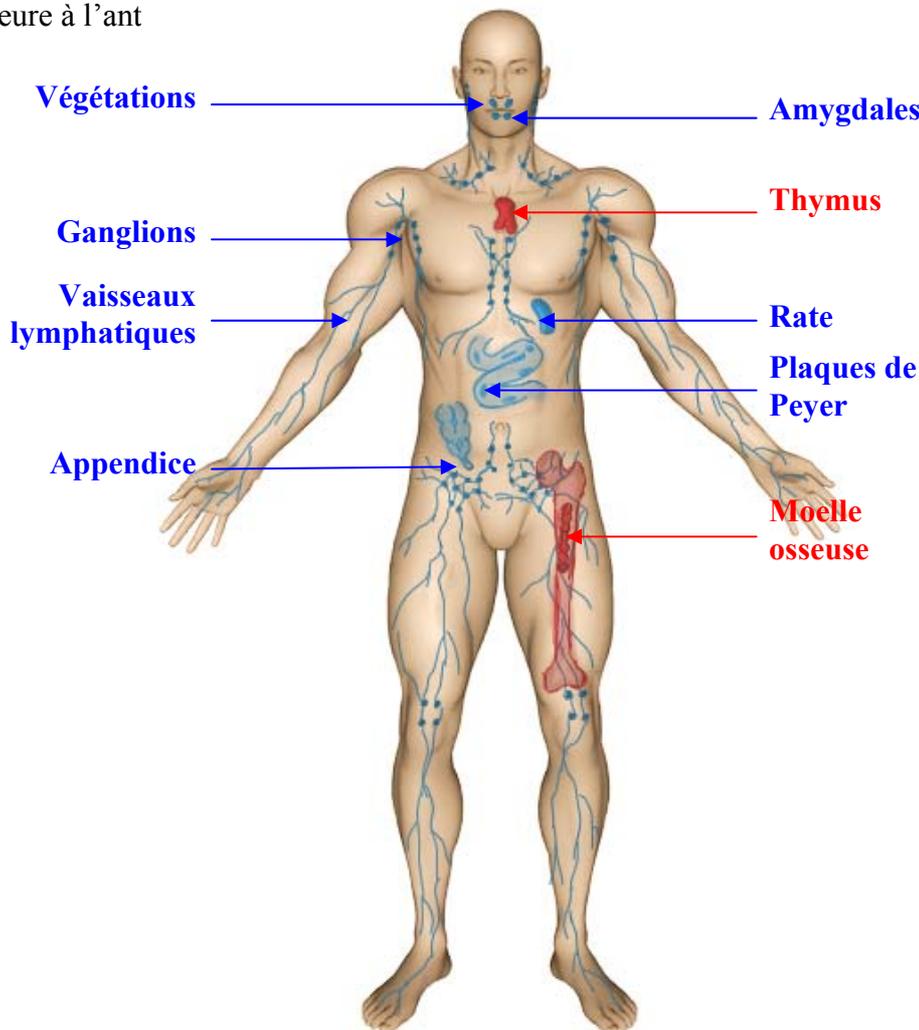


Figure 8 : Le système lymphoïde

Les organes et tissus lymphoïdes sont interconnectés par les vaisseaux sanguins et lymphatiques où circulent les cellules immunitaires. En rouge les organes lymphoïdes primaires, en bleu les organes lymphoïdes secondaires

3- L'immunité naturelle ou innée

Tous les organismes multicellulaires, y compris les plantes, les invertébrés et les vertébrés, possèdent des mécanismes intrinsèques de défense contre les pathogènes. Le terme d'immunité naturelle (ou innée) fait référence au fait que ce type de défense développé par l'hôte est toujours présent chez les individus sains, prêt à bloquer l'entrée des pathogènes et à éliminer rapidement ceux qui ont réussi à pénétrer dans les tissus. L'immunité innée est une réponse immédiate qui survient chez tout individu en l'absence d'immunisation préalable ; elle constitue la première barrière de défense vis-à-vis de divers agents pathogènes et assure un rôle de sentinelle vis-à-vis de l'apparition de tumeurs.

La première ligne de défense de l'immunité innée est constituée par les barrières épithéliales, par des cellules spécialisées, ainsi que par les peptides antimicrobiens naturellement présents dans les épithéliums. Elle est en grande partie assurée par des cellules phagocytaires (monocytes, polynucléaires), des lymphocytes spécialisés appelés cellules tueuses ou Natural Killers (NK) qui ne possèdent pas de récepteurs spécifiques de l'antigène, et par plusieurs protéines plasmatiques, notamment les protéines du système du complément (Tableau IV).

Tableau IV : Les acteurs de l'immunité innée

Effecteurs	Composants	Action
Epithélium	Cellules Peptides antimicrobiens	Rôle de barrière physique et chimique contre les infections
Phagocytes	Neutrophiles Monocytes/macrophages	Reconnaissance et ingestion des microorganismes au niveau des sites d'infection
Lymphocytes	Cellules NK	Action contre les pathogènes intracellulaires (tue les cellules et sécrète l'IFN- γ qui active les macrophages)
Le complément	Ensemble de protéines circulantes ou associées aux membranes	Cascade enzymatique qui permet la dégradation directe des pathogènes
Cytokines		Elles sont sécrétées par les macrophages et ont une fonction de médiateurs des réactions cellulaires de l'immunité innée.

Les cellules de l'immunité innée expriment des récepteurs spécialisés les récepteurs Toll ou TLR (Toll-like receptors) se liant à différents composés bactériens : des peptidoglycanes et des lipoprotéines bactériennes dans le cas de TLR2, le lipopolysaccharide

de bactéries à Gram- dans le cas de TLR4, la flagelline dans le cas de TLR5, et les motifs CpG non méthylés, caractéristiques de l'ADN bactérien dans le cas de TLR9 (Akira et coll., 2001). Tout ces mécanismes de l'immunité innée reconnaissent et réagissent contre les pathogènes, mais restent inactifs contre des substances étrangères non infectieuses.

L'immunité naturelle est efficace contre les bactéries car certains constituants de surface sont restés constants au cours de l'évolution. Ces éléments structuraux sont conservés chez un grand nombre de bactéries différentes et des récepteurs à ces composants, les PRR, sont présents essentiellement à la surface des cellules phagocytaires. Il faut noter que beaucoup de microorganismes ont des capsules qui masquent les molécules de surface. Ces capsules inhibent l'action des cellules de l'immunité innée. Bien que non-spécifique, la réponse innée présente l'avantage d'avoir à sa disposition, de façon immédiate, un grand nombre de cellules portant les PRR et prêtes à combattre les pathogènes sans les avoir rencontrés auparavant. Du fait de ces modalités, la réponse innée ne développera pas de mémoire vis à vis du pathogène et ne se modifiera pas malgré de multiples rencontres avec le même pathogène (Castex, 2003). L'immunité naturelle n'est pas toujours suffisante pour éradiquer le pathogène, mais elle est indispensable pour assurer une première défense en attendant que l'immunité adaptative ne prenne le relais (4 à 5 jours). L'immunité innée est le premier acteur de la réaction immunitaire, elle est nécessaire à la mise en place subséquente de l'immunité adaptative (Figure 6).

✓ *Effecteurs mis en jeu*

Dès l'entrée d'un pathogène dans l'organisme, des molécules et des cellules spécialisées appartenant au système immunitaire inné sont déployées. Les phagocytes constituent la première ligne de défense contre beaucoup de microorganismes communs, mais ils ne peuvent éliminer tous les agents infectieux ni reconnaître tous les microorganismes. Les monocytes, les macrophages et les neutrophiles sont les phagocytes les plus efficaces et possèdent des récepteurs membranaires de type PRR capables de se lier à des molécules de surface des bactéries tels que le lipopolysaccharide (LPS), le peptidoglycane (Figure 9) (Castex, 2003).

Outre les neutrophiles et les macrophages, les éosinophiles sont peu actifs en termes de phagocytose mais produisent surtout des molécules oxydantes stockées dans leurs granules, les oxydations participant à la mort des microorganismes. Plaquettes, lymphocytes et cellules endothéliales participent également à l'inflammation essentiellement par la

production de molécules pro-inflammatoires telles que des cytokines et des médiateurs lipidiques (Castex, 2003).

Enfin, une population particulière de lymphocytes, les cellules NK (Natural Killer ou tueuses naturelles) participent activement à la réponse innée.

En plus des cellules, de nombreuses molécules sont impliquées. Il s'agit de facteurs plasmatiques : complément, kinines, fibrine et plasmine de médiateurs lipidiques tels que les prostaglandines, les leukotriènes et le *Platelet Activation Factor* (PAF). Des peptides sont également retrouvés, parmi lesquels les peptides antimicrobiens et des amines.

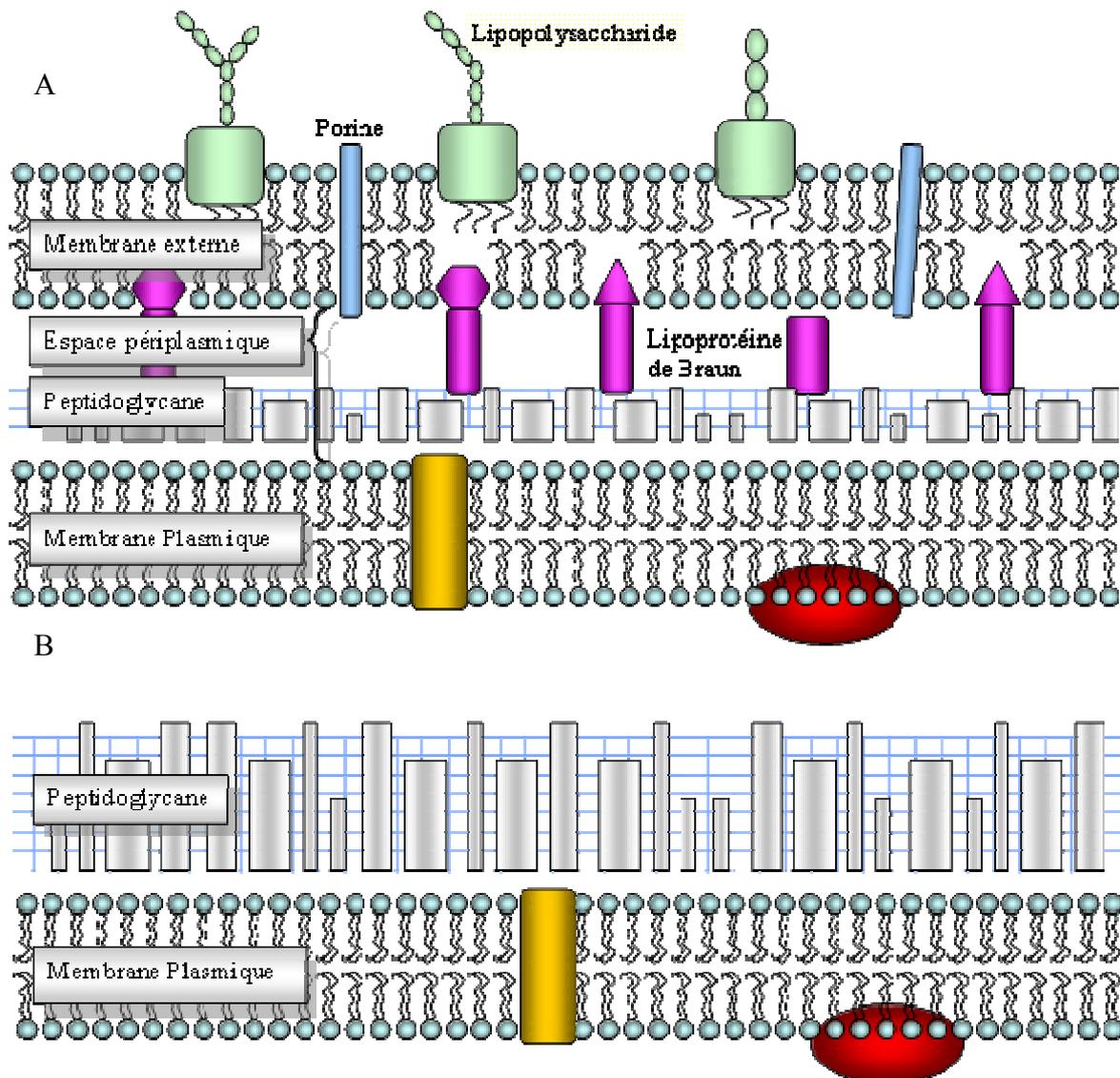


Figure 9 : Représentation schématique de la structure des membranes bactériennes

A : Membrane des bactéries Gram- ; B : Membrane des bactéries Gram+

La membrane des bactéries Gram- est composée d'une double membrane lipidique, entre lesquelles il y a une faible épaisseur de peptidoglycane. La membrane des bactéries Gram+ est formée d'une membrane plasmique surmontée d'une épaisse couche de peptidoglycane (PG)

4- Rôle de l'immunité innée dans la stimulation des réponses immunitaires adaptatives

Les réponses immunitaires innées génèrent des molécules qui assurent la fonction de *seconds messagers*, afin d'activer, conjointement avec les antigènes, les lymphocytes T et B. Ces seconds signaux dépendants des pathogènes assurent que les lymphocytes répondent aux agents infectieux et non à des substances non-infectieuses inoffensives.

L'initiation des réponses par les lymphocytes T nécessite que de multiples récepteurs situés sur les lymphocytes T reconnaissent des ligands qui se trouvent sur les CPAg. Les pathogènes, ainsi que l'IFN- γ produit par les cellules NK, stimulent les cellules dendritiques et les macrophages à produire deux types de seconds signaux susceptibles d'activer les lymphocytes T. En premier lieu, les cellules dendritiques et les macrophages expriment des molécules de surface : les molécules de costimulation, qui se lient à des récepteurs situés sur les lymphocytes T naïfs et agissent, simultanément à la reconnaissance de l'antigène, pour activer les lymphocytes T. En second lieu, les cellules dendritiques et les macrophages sécrètent la cytokine IL-12, qui stimule la différenciation des lymphocytes T naïfs en cellules effectrices de l'immunité adaptative à médiation cellulaire (Figure 10).

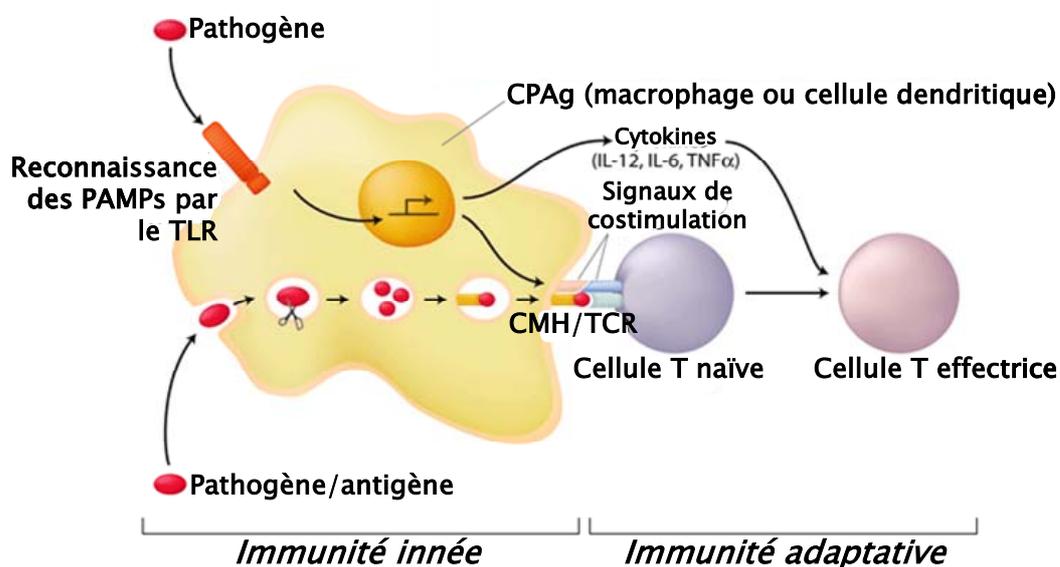


Figure 10 : L'immunité innée est nécessaire à la réponse immunitaire adaptative

La réponse immunitaire adaptative nécessite la reconnaissance préalable de l'antigène par le système immunitaire inné, qui présente ensuite l'antigène associé aux molécules du CMH

Un autre exemple démontre que la production d'auto-anticorps par les lymphocytes B auto-réactifs implique certains récepteurs Toll et en particulier TLR9 se liant à l'ADN bactérien. Ces données établissent un lien critique entre les systèmes immunitaires innés et adaptatifs dans le développement des maladies autoimmunes (Leadbetter et coll., 2002).

Le C3d, protéine produite lors de l'activation du complément, se fixe de manière covalente aux pathogènes. Lorsque les lymphocytes B reconnaissent les antigènes microbiens, ils reconnaissent en même temps la liaison du C3d avec le pathogène, par l'intermédiaire d'un récepteur au C3d. Cette double reconnaissance antigène/C3d initie le processus de différenciation des lymphocytes B en cellules sécrétrices d'anticorps.

Ainsi, les seconds messagers permettent de stimuler l'immunité adaptative, mais également d'orienter la nature de la réponse immunitaire adaptative.

En parallèle, les acteurs du système immunitaire adaptatif sont capables de stimuler l'immunité innée. Ainsi, les lymphocytes T activent les macrophages qui ont phagocyté les pathogènes, entraînant une augmentation de l'action antimicrobienne des phagocytes et la destruction des germes ingérés.

En conclusion, il existe des liens majeurs entre la réponse immunitaire innée et la réponse immunitaire adaptative, dont l'importance aussi bien dans la physiologie du système immunitaire que dans la physiopathologie de l'allergie ou des maladies auto-immunes commence à émerger.

En plus de l'interaction entre ces deux systèmes, il apparaît que le système immunitaire est en relation étroite avec le système nerveux, avec lequel il communique, et que le dérèglement de l'un peut être à l'origine du dérèglement de l'autre. Ainsi les états de stress peuvent être à l'origine du dérèglement du système immunitaire. Dans le chapitre suivant, je vais présenter les liens existants entre les acteurs de l'immunité et les états de stress.

II- Relations entre le système nerveux et le système immunitaire inné

1 – Introduction

La réponse inflammatoire locale est caractérisée par la rougeur, la douleur et la chaleur (*rubor, dolor, calor*). Ces effets physiologiques ont pour origine une stimulation nerveuse et endocrine (liée à l'hypothalamus) (Figure 11). Les composants cellulaires et moléculaires de la réponse immunitaire innée représentent la première ligne de défense contre l'invasion des pathogènes (Cook et coll., 2004), grâce à la reconnaissance de molécules associées aux pathogènes (PAMPs : pathogen-associated molecular patterns) (Beutler, 2005). Le système nerveux central (SNC) est capable de réguler l'immunité innée par des voies endocrines et neuronales. Les systèmes nerveux sympathique et parasympathique inhibent la réponse immunitaire innée au niveau systémique et local, tandis que le système périphérique a tendance à amplifier la réponse locale de l'immunité innée.

Les cytokines et les médiateurs de l'immunité libérés par le système immunitaire inné activent rapidement la réponse neuronale qui amplifie à la fois la réponse immunitaire locale et déclenche les réponses neuroendocrines systémiques et neuronales qui permettent un retour à l'état physiologique (Jacque, 2003). Ce système forme une boucle de rétrocontrôle qui optimise la réponse inflammatoire. Une réponse trop longue ou inappropriée du SNC provoquera une réponse inflammatoire aiguë ou une infection incontrôlée ; ce qui aura des conséquences délétères tels un choc toxique, ou des destructions tissulaires, pouvant conduire à une issue fatale.

2 – Les liens entre le SNC et l'immunité

Le système nerveux est un partenaire idéal du système immunitaire inné dans la défense immédiate non spécifique de l'hôte. En effet, il réagit rapidement (de l'ordre de la milliseconde à la minute) à de nombreux stimuli environnementaux non spécifiques. Les neurotransmetteurs et les neuropeptides se lient aux récepteurs couplés aux protéines G qui activent les mêmes voies de signalisation secondaires (telles que celles impliquant la protéine kinase A (PKA), l'AMPc et la protéine kinase C (PKC) que celles déclenchées par les médiateurs de l'immunité. Ces médiateurs agissent l'un sur l'autre souvent par les récepteurs des neurotransmetteurs (Grimm et coll., 1998) et modulent également les voies neurales qui sont liées à la réponse de phase aiguë, telle que la douleur (Watkins et coll., 1999 et Milligan

et coll., 2005). Alternativement, les neuropeptides (tels que la substance P) provoquent la libération des médiateurs pro-inflammatoires (l'histamine) qui peuvent amplifier ou faciliter l'inflammation en augmentant la vasodilatation, le flux sanguin et la circulation des leucocytes vers le lieu de l'inflammation.

Les effets des facteurs neuronaux sur la réponse inflammatoire, rapides au début, fluctuent dans le temps afin de moduler cette réponse (Madden et coll., 1989 et Dhabhar, 1998). Ainsi, le système nerveux est situé idéalement pour moduler la réponse inflammatoire non spécifique immédiate à la stimulation immunitaire, en synergie avec lui, pour répondre à l'agression des microbes pathogènes.

La régulation de l'immunité par le SNC a lieu par les voies systémiques (figure 15). Le système nerveux périphérique fournit une première ligne de défense par la libération des neuropeptides qui augmentent la réponse inflammatoire. Le système nerveux sympathique (ou adrénergique) (SNS), et le système nerveux parasympathique (ou cholinergique) (SNP) bloquent l'inflammation. Les réponses neuroendocrines commandent l'inflammation à un niveau systémique, entre autre par l'axe Hypothalamo-Hypophyso-Surrénalien (HHS) (Figure 11) grâce aux effets anti-inflammatoires des glucocorticoïdes libérés par le cortex surrénalien.

Les résultats cités dans la littérature ont montré que les cellules immunitaires contiennent la *machinerie* moléculaire nécessaire pour répondre aux facteurs neuronaux, y compris les récepteurs des neurotransmetteurs, des neuropeptides et des neurohormones, ainsi que les composants de leurs voies de signalisation. Cependant, il existe toujours une controverse concernant les types spécifiques de cellules immunitaires qui expriment les récepteurs neuronaux et la signification biologique de la modulation neuronale des réactions immunitaires (Kawashima et coll., 2004). En outre, les facteurs neuronaux pourraient avoir des effets variables en fonction de l'étape de la réaction immunitaire, ou du niveau de maturation des cellules immunitaires (Woltman et coll., 2002 et Maestroni et coll., 2003).

Par ailleurs, bien que les effets des produits des agents pathogènes, tels que le LPS, sur les réponses du SNC aient été depuis longtemps caractérisés, l'analyse de leurs mécanismes est récente. Les LPS déclenchent l'inflammation directement par le TLR4, sans participation des cytokines périphériques (Chakravarty et coll., 2005). La microglie dans le SNC exprime les TLR après exposition à divers pathogènes ou produits de pathogènes (tels que des LPS, le peptidoglycane et le CpG ADN). Les souris déficientes en protéine adaptatrice du TLR MyD88 (gène de la réponse primaire de différenciation de la myéloïde) montrent une diminution de la réponse inflammatoire due au SNC lors de l'infection par *streptococcus pneumoniae* (Koedel et coll., 2004 ; Olson et coll., 2004 et Beutler, 2005).

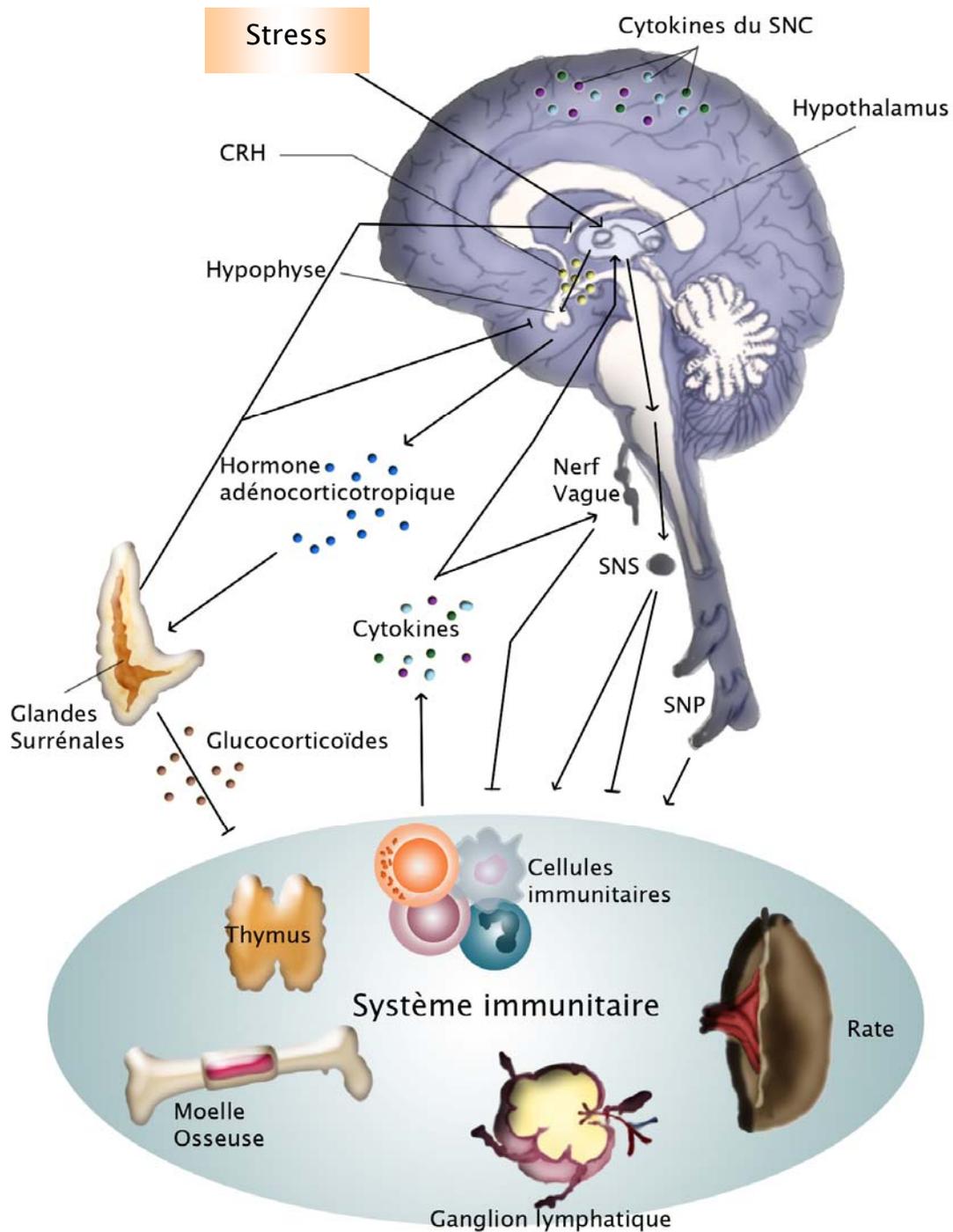


Figure 11 : Illustration des connexions entre le système immunitaire et le système nerveux

Sur le schéma figure la communication entre le système immunitaire et le système nerveux selon les voies systémiques, le nerf vague, l'axe HHS, le SNS et le système nerveux périphérique (Sternberg, 2006)

3- Contrôle du SNS sur l'immunité

Les études *in vivo* dans lesquelles le SNS est ôté, par sympathectomie chimique ou chirurgicalement par coupure de l'innervation sympathique des organes lymphoïdes, indiquent

que le SNS a un rôle important dans la régulation de l'immunité. Bien que quelques études prouvent que les catécholamines et l'activation du SNS augmentent les réponses immunitaires pro-inflammatoires (Figure 12) (Madden et coll., 1995 et Johnson et coll., 2005), la plupart des études indiquent que les effets du SNS sont inhibiteurs (Maestroni et coll., 2003).

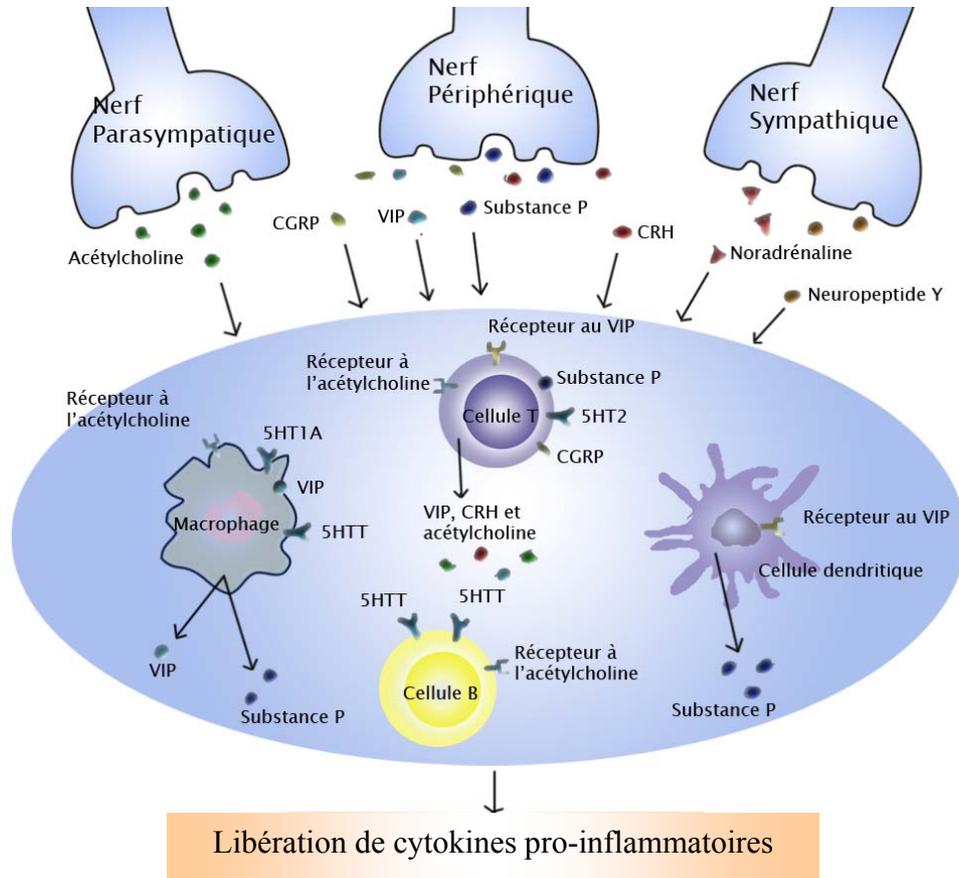


Figure 12 : Effet du système nerveux sur les cellules immunitaires et les organes lymphoïdes

Les neurotransmetteurs libérés par les terminaisons nerveuses peuvent jouer un rôle direct et indirect sur la réponse immunitaire

L'activation du SNS qui se produit suite à un stress, tel que l'exercice physique ou la contrainte psychologique, est associée à la diminution de l'activité des cellules NK (Benschop et coll., 1994). Un prétraitement par des antagonistes des récepteurs adrénergiques inhibe cet effet. En outre, la signalisation excessive du SNS sur le système immunitaire, provoqué lors d'une libération importante de noradrénaline (par exemple, peu après sympathectomie chimique), est immunosuppressive (Chelmicka-Schorr et coll., 1988 et Madden et coll., 1989). *In vitro*, la noradrénaline module ses effets immunosuppressifs sur les CD4 et les monocytes en empêchant la production des cytokines pro-inflammatoires, y compris le TNF, IL-1, IL-6 et IL-12, tout en augmentant la production des cytokines anti-inflammatoires, telles que IL-10, de ces cellules (Van der Poll et coll., 1994 et Maestroni et coll., 2003). Le blocus

pharmacologique des récepteurs adrénergiques renforce la sécrétion d'IL-6 et inhibe *in vivo* la sécrétion d'IL-10 (Haskó et coll., 1995 et Woiciechowsky et coll., 1998). La noradrénaline augmente la sécrétion de la chimiokine chimiotactique CXCL8 et également la migration des cellules NK, des monocytes et des macrophages, mais bloque *in vitro* la migration des CD4 (Straub et coll., 2000a ; Lang et coll., 2003 et Maestroni et coll., 2003). La noradrénaline inhibe *in vitro* la réponse chimiotactique des CD4 aux chimiokines CCL19 et CCL21 (importantes pour la migration des CD4 depuis les ganglions lymphatiques vers l'antigène), par l'augmentation de la production d'IL-10 anti-inflammatoire (Maestroni et coll., 2003). L'ensemble de ces données, laisse supposer que les effets du SNS sur les CD4 pourraient avoir non seulement un rôle anti-inflammatoire, mais également pourraient contribuer à l'élimination des pathogènes et à la modulation de la réponse adaptative (Maestroni et coll., 2003). Cependant, comme l'épuisement de la noradrénaline réduit la résistance à quelques infections bactériennes (Straub et coll., 2000a), le rôle des réponses du SNS dans la défense bactérienne de l'hôte reste à déterminer.

✓ *Effets du Neuropeptide Y sur les cellules immunitaires*

Le Neuropeptide Y (NPY) est synthétisé et libéré simultanément avec la noradrénaline entre autre par les neurones sympathiques (Schwarz et coll., 1994) (Figure 12).

Le NPY se lie à cinq récepteurs différents couplés aux protéines-G (Y1-5), qui sont exprimés de façon différentielle dans les tissus (Larhammar, 1996). Le récepteur Y1 est exprimé largement dans tout le corps, tandis que les récepteurs Y2 et Y5 sont principalement exprimés dans le SNC. L'exposition des macrophages au NPY empêche la sécrétion d'IL-6 (Straub et coll., 2000a et Straub et coll., 2000b).

4- Effets des facteurs de la surrénale sur l'immunité

a- L'axe HHS : agent de la régulation de la réponse immunitaire

L'axe HHS forme une boucle de rétroaction physiologique de l'inflammation grâce aux effets anti-inflammatoires des glucocorticoïdes. Bien que le prix Nobel ait été attribué à PS Hench pour l'usage des glucocorticoïdes dans le traitement du rhumatisme articulaire en 1950 (Hench et coll., 1950), ce n'est que récemment que le rôle physiologique essentiel des glucocorticoïdes dans la régulation de la fonction des cellules immunitaires a été identifié. Par exemple, dans la réponse immunitaire adaptative, les glucocorticoïdes provoquent la transition d'un type cellulaire (T_{H1}) à un autre type cellulaire (T_{H2}), en grande partie en

bloquant la production de l'IL-12 par les cellules dendritiques (CDs) et les macrophages (Figure 13) (Agarwal et coll., 2001).

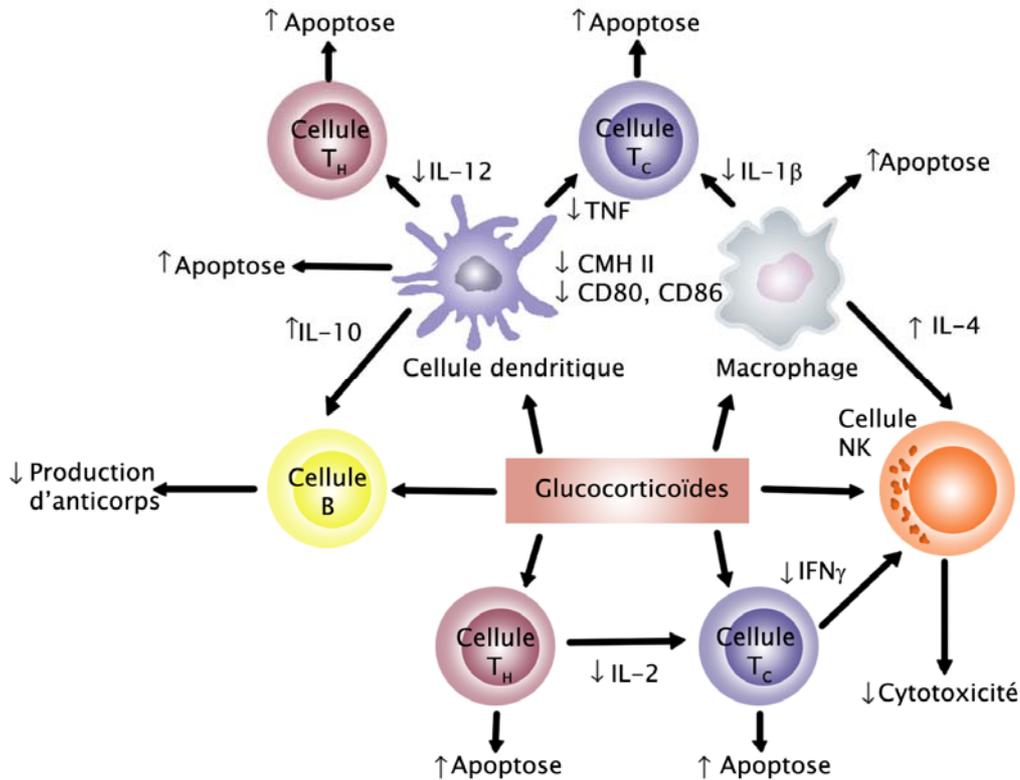


Figure 13 : Effets des glucocorticoïdes sur les cellules immunitaires

Les glucocorticoïdes peuvent agir sur les cellules immunitaires à la fois directement et indirectement pour supprimer la réponse inflammatoire (Sternberg, 2006)

b- Rôle de la médullo-surrénale sur l'immunité

Réciproquement, l'activation de la réponse inflammatoire par des pathogènes provoque la libération rapide des cytokines (IL-1 et TNF), qui stimulent le SNS pour libérer la noradrénaline. Cette boucle de rétrocontrôle négative bloque la production pro-inflammatoire et permet de moduler la réponse inflammatoire afin de restaurer l'homéostasie. En revanche, la stimulation de la migration des cellules immunitaires due à la noradrénaline et la production de CXCL8 indique que la libération locale ou régionale de noradrénaline servirait à conserver une partie des réactions immunitaires innées et de l'inflammation locale, afin de favoriser la guérison de la blessure.

Puisque la noradrénaline et le NPY, libérés par les terminaisons des nerfs sympathiques, agissent sur la régulation régionale des organes immunitaires, l'adrénaline et le NPY, libérés par la médullo-surrénale, peuvent réguler l'immunité de façon systémique. L'administration directe d'adrénaline diminue *in vivo* le nombre de monocytes circulant, de

cellules B et T, et de cellules NK, grâce à la signalisation par le biais des récepteurs β -adrénergiques exprimés par les cellules immunitaires (Jetschmann et coll., 1997 et Oberbeck et coll., 2004). Chez les modèles animaux, bien que l'infusion d'adrénaline n'ait aucun effet sur la mortalité par choc toxique, le blocus des récepteurs β -adrénergique augmente la mortalité, accentuant ainsi le rôle du SNS (Oberbeck et coll., 2004).

En plus de l'adrénaline, la médullo-surrénale contient et libère de grandes quantités d'IL-6 et de TNF en réponse aux stimuli inflammatoires, tels que des LPS, l'IL-1 α et l'IL-1 β (Papanicolaou et coll., 1996). La découverte des peptides antimicrobiens dérivés des chromogranines qui sont libérés simultanément avec l'adrénaline par les cellules chromaffines de la médullo-surrénale (Metz-Boutigue et coll., 2003b), couplée à la présence des TLRs sur les cellules du cortex surrénale, augmente la possibilité que les glandes surrénales aient un rôle plus direct dans l'activation des réactions immunitaires innées et l'élimination des agents infectieux (Tableau V).

5- Conclusion

L'activation du système immunitaire inné en réponse à l'identification des pathogènes fournit les deux signaux initiaux pour l'induction de la réponse inflammatoire, aussi bien que pour l'activation de la réponse régulée du SNC qui met fin à l'inflammation. L'activation du système nerveux périphérique sur les lieux de l'inflammation sert à augmenter les réactions immunitaires innées et à stimuler la libération des médiateurs vasoactifs qui favorisent le recrutement des cellules immunitaires et amplifient l'élimination des pathogènes. Suite à cette élimination, l'activation de l'axe HHS, du SNS et du système nerveux parasympathique atténuent les réponses inflammatoires et rétablissent l'homéostasie. La perturbation de ces voies inhibitrices induirait l'activation non contrôlée des réactions immunitaires innées qui conduiraient à un état délétère.

Tableau V : Interaction entre les facteurs neuronaux et endocrines et les acteurs de l'immunité innée

- : effet inhibiteur, + : effet activateur, α -MSH : α -mélanocyte-stimulating hormone, CCL : CC-chimiokine ligand, CGRP : calcitonine gene related peptide, CRH : Corticotropin-releasing hormone, CXCL : CXC-chimiokine ligand, IL : Interleukine, ND : non déterminé, TNF : Tumor-Necrosis facteur, VIP : Vasoactive Intestinal Peptide

	TLR	CDs	Macrophages	Cellules NK	Cytokines (IL-1, IL-6, IL-12, TNF)	Chimiokines (CCL2 et CXCL8)
Glucocorticoïde	+	-	-	-	-	-
Noradrénaline	ND	ND	-	-	-	+
Neuropeptide Y	ND	ND	-	ND	-	ND
Acétylcholine	ND	ND	-	ND	-	+
CRH	ND	ND	ND	+	+	ND
CGRP	ND	-	ND	+	+	+
Substance P	ND	ND	ND	ND	+	+
α-MSH	-	ND	ND	ND	-	+
Opioides	ND	ND	ND	ND	-	+
VIP	-	ND	-	-	-	-
Œstrogène	ND	-	ND	ND	-	-
Progestérone	ND	+	ND	ND	ND	-

Les mécanismes grâce auxquels les cellules immunitaires produisent des neuromédiateurs, ou y répondent, doivent être décryptés. De plus, les mécanismes de signalisation et les circonstances physiologiques d'une telle régulation demeurent en grande partie inconnus. Approfondir cette voie de recherche devrait fournir des informations sur les mécanismes moléculaires et le rôle physiologique des liens existant entre le système immunitaire et le SNC à la fois au niveau systémique, régional et local. L'objectif de ces recherches est la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires aboutissant au déclenchement ou non d'une maladie infectieuse.

Comme nous venons de le voir, le système nerveux et le système immunitaire sont liés. Parmi les peptides sécrétés dans les états de stress, il faut noter la place non négligeable des peptides antimicrobiens, ces peptides occupant une place de choix dans le système immunitaire inné. Ces peptides sont également au centre de plusieurs thèmes de recherches développés dans notre équipe. Voilà pourquoi, dans le chapitre suivant je vais présenter les peptides antimicrobiens, du point de vue structural et biologique.

Chapitre III : Les peptides antimicrobiens (PAMs)

I- Introduction

Le système immunitaire inné est la première barrière que doivent franchir les micro-organismes. Cette barrière est constituée de divers éléments tels que la continuité épithéliale, les glandes muqueuses, les cils, le pH acide, les phagocytes, la cascade du complément et les facteurs humoraux non spécifiques. Les peptides antimicrobiens (PAMs), appartenant aux facteurs humoraux non spécifiques, sont un élément important de l'immunité innée. Ces peptides existent chez tous les eucaryotes, et en particulier chez les mammifères, les amphibiens, les insectes, les plantes, les protozoaires (Gabay, 1994). Ils sont présents également chez les procaryotes puisque les bactéries, elles-mêmes, produisent des PAMs et environ 50 d'entre eux ont été isolés de diverses bactéries à Gram+ (Lüders et coll., 2003).

A l'heure actuelle, plus de 880 peptides antimicrobiens ont été caractérisés (<http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/pag1.htm>). Beaucoup de ces peptides sont issus de la maturation d'un prépeptide : une séquence signal, un pro-segment et un peptide qui possède des activités antimicrobiennes (Figure 14) (Bals, 2000). Les PAMs ont été classés en fonction de leur structure, de leur composition en acides aminés et de leur taille.

Les peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules chromaffines de la médullo-surrénale lors d'une stimulation de l'axe hypothalamo-hypophysé-surrénalien appartiennent essentiellement à la famille des peptides cationiques, présentés ci-après.

II- Les peptides antimicrobiens cationiques

Les peptides cationiques amphipathiques existent chez tous les organismes complexes (Hancock et coll., 2000). Ils sont composés de chaînes de 12 à 50 acides aminés avec 2 à 9 résidus chargés (lysine ou l'arginine) et jusqu'à 50 % d'acides aminés hydrophobes. Ils se replient selon une variété de structures secondaires (souvent après insertion dans les bicouches membranaires) dans lesquels les résidus chargés et polaire, et les résidus hydrophobes se répartissent distinctement sur chaque face de la molécule (Hancock et coll., 2002).

Ils sont classés principalement en trois catégories (Boman, 1995 ; Nicolas et coll., 1995 ; Nissen-Meyer et coll., 1997 et Hancock, 1997b) :

- les peptides linéaires ou hélicoïdaux,
- les peptides ayant un grand nombre de résidus proline,
- les peptides structurés en feuillet β .

Les cathélicidines sont présentes dans chacun de ces trois groupes (Scocchi et coll., 1997 et Scocchi et coll., 1999). Ce sont des peptides de structure et de séquence très variables. Tous ont un pourcentage élevé en acides aminés basiques (Arginine / Lysine) (Gennaro et coll., 2000 et Travis et coll., 2000). Ils ont une pré-prorégion N-terminale commune, d'environ 100 résidus, homologue à la cathéline (inhibiteur de protéases à sérine) (Zanetti et coll., 1995). La partie C-terminale, très variable contient le domaine cationique antimicrobien. Après synthèse, la partie C-terminale est clivée, formant ainsi le peptide antimicrobien mature (Figure 14). Ces peptides présentent de fortes activités (CMI allant de 0,03 à 32 $\mu\text{g/ml}$) contre des bactéries Gram+ et Gram-.

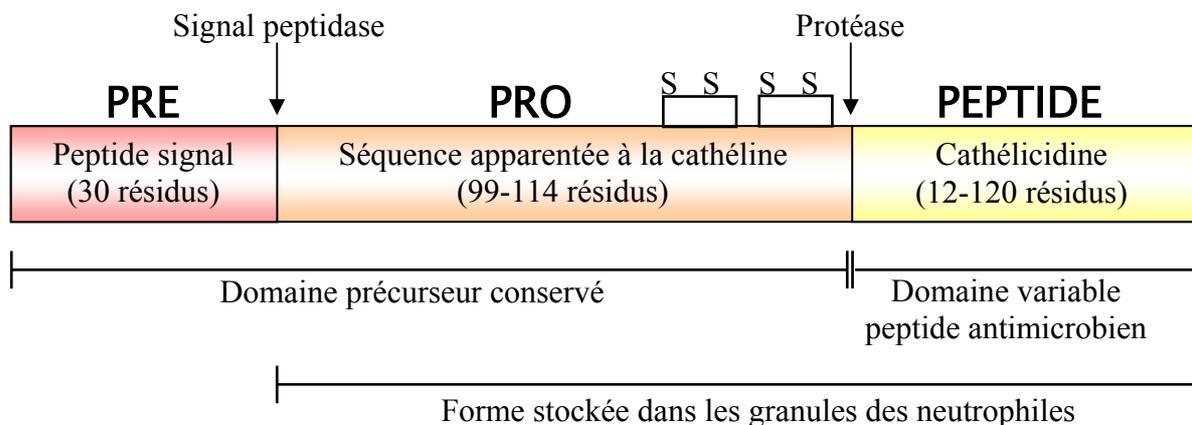


Figure 14 : Organisation des cathélicidines sous forme de prépropeptides

1 – Peptides linéaires en hélice α amphipathique

Ces peptides de 20 à 40 résidus, sont linéaires ou hélicoïdaux, ne contiennent pas de résidus cystéine, et peuvent avoir une *charnière* dans leur milieu. En présentant une structure en hélice- α , ils adoptent une conformation amphiphile nécessaire pour perméabiliser la membrane bactérienne. Les cathélicidines animales de ce groupe incluent : les PAMPs, les SMAPs, les BMAPs et les eCATHs.

Les PAMPs (myéloïd antimicrobial peptides from pigs) sont des peptides très cationiques actifs contre les bactéries Gram+ et Gram- (Zhang et coll., 2000), les levures (Lee et coll., 2001) et les champignons (par interaction avec la membrane plasmique) avec des CMI allant de 2 à 16 μM (Zanetti et coll., 1994 et Zhang et coll., 2000).

Les SMAPs (myéloïd antimicrobial peptides from sheep) ont une activité à large spectre contre les bactéries Gram+ et – et les champignons avec des CMI allant de 0,1 à 20 $\mu\text{g/ml}$. Ils sont capables de tuer *Pseudomonas aeruginosa* (Bagella et coll., 1995 ; Mahoney et coll., 1995 ; Skerlavaj et coll., 1999 ; Travis et coll., 2000 ; Brogden et coll., 2001 et Saiman et coll., 2001).

Les BMAPs (myéloïd antimicrobial peptides from cattle) ont une conformation en hélice α amphipathique, sont actifs sur un large spectre de micro-organismes avec une CMI entre 0,25 et 4 μM et ne sont pas actifs contre les cellules eucaryotes (Gennaro et coll., 1998).

Les cathélicidines équines (myéloïd antimicrobial peptides from horses) sont actifs contre les bactéries et en particulier eCATH-1 est efficace contre les bactéries à Gram+ et les bactéries à Gram- à des concentrations allant de 12 à 50 μM (Skerlavaj et coll., 2001).

2- Les peptides linéaires riches en proline

Ces peptides constitués de 40 à 80 résidus, sont linéaires et ne possèdent pas de résidus cystéine. Ils sont riches en proline, arginine, glycine ou tryptophane.

Les bacténécines (Bac5, Bac7), sont riches en arginine et proline avec des motifs P-R-P et présentent de puissantes activités antimicrobiennes *in vitro* avec une CMI allant de 1,25 à 20 μM (Gennaro et coll., 1989 et Frank et coll., 1990).

Le PR-39 (antimicrobial porcine peptide), est riche en proline et arginine, n'est actif (en bloquant la synthèse d'ADN) que contre les bactéries à Gram- (Boman et coll., 1993 et Shi et coll., 1994) et *Mycobacterium tuberculosis* avec une CMI allant de 17 à 92 $\mu\text{g/ml}$ (Linde et coll., 2001). Il possède également diverses activités sur la physiologie des cellules eucaryotes (Huang et coll., 1997 ; Chan et coll., 2001 et Ikeda et coll., 2001).

La prophénine est riche en résidus proline et phénylalanine. La prophénine-1 est plus active *in vitro* contre *Escherichia coli* que contre *Listeria monocytogenes*, elle a une CMI allant de 2,5 à 5 $\mu\text{g/ml}$ (Harwig et coll., 1995).

L'indolicine est un peptide riche en tryptophane actif contre les bactéries Gram+ et Gram- dont la CMI est inférieure à 10 µg/ml (Selsted et coll., 1993).

3- Les peptides organisés en feuillet β

Ces peptides formés de 16 à 40 résidus, qui forment une structure en feuillet β , sont riches en résidus cystéine, et possèdent deux ou plusieurs ponts disulfures. Les principaux peptides de cette classe sont : les défensines α , les défensines β et les protégrines.

Les défensines α sont détectées en particulier chez l'homme. Elles sont actives à 1-100 µg/ml contre les bactéries à Gram- et Gram+, les mycobactéries, les champignons et les virus à enveloppe (Lehrer et coll., 1983 ; Lehrer et coll., 1985 ; Lehrer et coll., 1988 et Ganz et coll., 1995). Elles sont stockées à fortes concentrations dans les granules des phagocytes (granulocytes et beaucoup de macrophages) et dans les cellules de Paneth (Ganz et coll., 1995) (Figure 15).

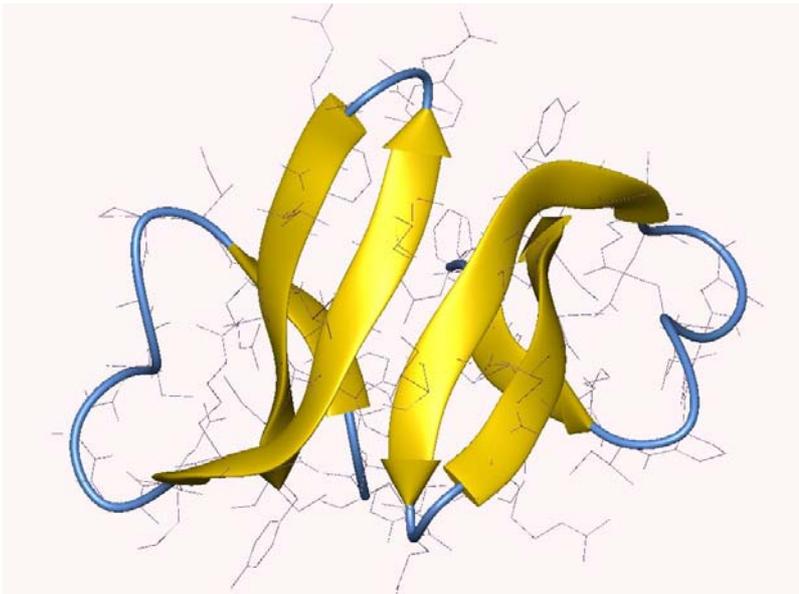


Figure 15 : Représentation d'une molécule d' α défensine
Les feuillets β sont représentés en jaune

Les défensines β sont riches en résidus arginine et se caractérisent par une activité cytotoxique, antivirale et antimicrobienne avec une CMI autour de 25µg/ml (Ganz et coll., 1990). Retrouvées fréquemment chez les mammifères, elles sont présentes dans de nombreux tissus : le tractus respiratoire, le tractus digestif, le thymus, le foie, les nodules lymphoïdes, le cerveau, la rate, les reins, la vessie, les testicules, la peau, le cœur, le muscle, la moelle

osseuse, les neutrophiles, les macrophages alvéolaires et le cordon ombilical (Figure 16) (Selsted et coll., 1993 et Yount et coll., 1999).

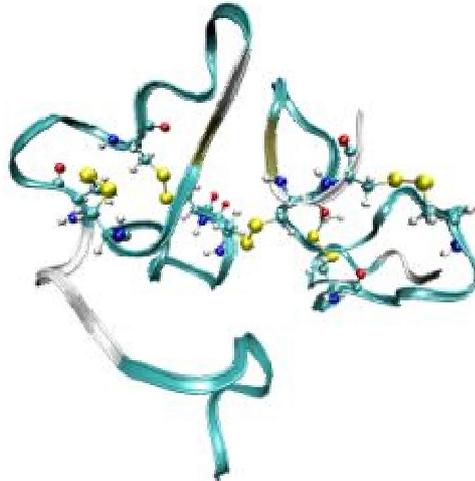


Figure 16 : Représentation d'un dimère de β défensine humaine

Les **protégrines** sont des peptides contenant naturellement cinq résidus cystéine, (Roumestand et coll., 1998). Elles sont actives contre les bactéries à Gram+, à Gram- et contre les champignons avec une CMI allant de 0,13 to 64 $\mu\text{g/ml}$ (Kokryakov et coll., 1993).

III- Action des peptides antimicrobiens dans le cadre de la réponse immunitaire

1- Introduction

De nombreux peptides ont une action directe contre les bactéries, champignons, parasites ou virus. De plus, les peptides cationiques jouent un rôle important dans la modulation de la réaction immunitaire innée. Une théorie récente propose l'action synergique des peptides antimicrobiens avec d'autres effecteurs de la réponse immunitaire, afin de polariser la réponse immunitaire adaptative et participer à la guérison.

2- Implication des PAMs cationiques dans l'immunité

Les premiers travaux sur ces peptides ont présenté leur action directe contre divers micro-organismes. Il est désormais évident que ces peptides ont diverses autres fonctions dans la modulation de l'immunité et de l'inflammation (Figure 17) (Hancock et coll., 2000 ; Yang

et coll., 2002 ; Zasloff, 2002 et Yang et coll., 2004). Par conséquent, il apparaît que le terme de peptides antimicrobiens est trop restrictif.

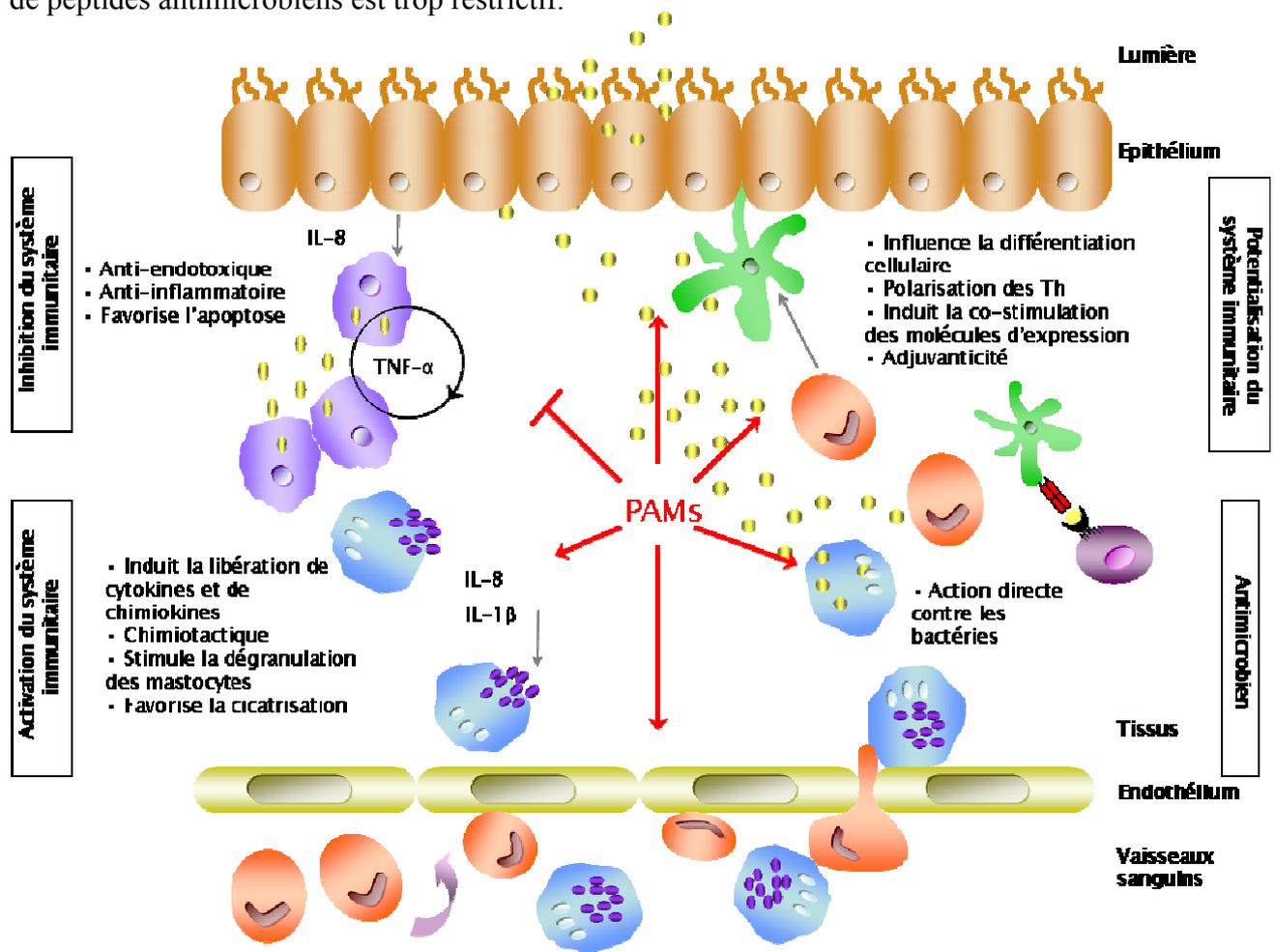


Figure 17 : Rôles des peptides antimicrobiens

Les PAMs peuvent tuer directement les pathogènes (représentés en jaune), ou interagir avec le système immunitaire

3- Peptides exprimés conjointement avec des éléments du système immunitaire

L'immunité innée est la forme la plus ancienne de défense immunitaire, conservée dans tout le règne animal, elle est essentielle à la défense des invertébrés. Les découvertes les plus récentes sur l'immunité innée (notamment celle de la famille des TLRs) ont mis en avant la complexité et l'hétérogénéité de ce système. Plusieurs caractéristiques des PAMs laissent supposer des rôles variés dans l'immunité :

- la grande diversité dans les séquences et les structures de ces peptides,
- les homologies entre les peptides des vertébrés et des invertébrés,

- la distribution dans de nombreuses cellules du système immunitaire (leucocytes, cellules de Paneth) et dans les tissus en contact avec des pathogènes (intestin, trachée),
- l'observation selon laquelle ils peuvent être exprimés et sécrétés constitutivement lors de l'inflammation.

L'expression des peptides matures (biologiquement actifs) exige la maturation protéolytique (Uzzell et coll., 2003), qui peut être constitutive ou inductible en fonction des espèces, du type de tissu, de la lignée cellulaire et/ou de l'état de différenciation de la cellule (Islam et coll., 2001 et Heilborn et coll., 2005). L'expression du gène et/ou la sécrétion de la protéine sont induites par des facteurs tels que les produits bactériens, les dommages cellulaires et/ou les stimuli inflammatoires. Les séquences en amont 5' flanquantes de la séquence programmée de la cathélicidine possèdent plusieurs séquences consensus potentielles pour des facteurs de transcription, y compris le facteur nucléaire NFκB (Zhao et coll., 1995 ; Gudmundsson et coll., 1996 et Tomasinsig et coll., 2005). La synthèse de hBD-2 est induite dans les monocytes par l'IL-1β et dans les cellules épithéliales intestinales par le LPS ou le peptidoglycane et dépend de NFκB (Hertz et coll., 2003 ; Liu et coll., 2003 ; Wang et coll., 2003 et Vora et coll., 2004), tandis que l'expression d'hBD-2 -3 induit par l'IL-22 dans les kératinocytes dépend du facteur de transcription STAT3 (Wolk et coll., 2004). Les agonistes d'IL-1, du TNF-α et du TLR activent également NFκB. Ce facteur de transcription est responsable de la transcription de multiples gènes impliqués dans les réactions inflammatoires et immunitaires chez les mammifères. Ces données démontrent que la régulation transcriptionnelle des peptides antimicrobiens dépend du type cellulaire et du type de stimulus. Ce processus est également régulé et/ou coordonné avec l'expression d'autres facteurs de l'immunité innée et de l'inflammation aiguë (Zhao et coll., 1995 ; Frohm Nilsson et coll., 1999 et Tomasinsig et coll., 2005).

4- Rôles physiopathologiques des PAMs

Le rôle des peptides antimicrobiens dans l'immunité est vérifié *in vivo* chez l'homme et la souris par l'expression des peptides antimicrobiens en liaison avec la susceptibilité ou la résistance aux infections bactériennes. Les patients présentant un syndrome spécifique d'insuffisance granulaire ont un déficit en α-défensines et souffrent d'infections bactériennes graves et fréquentes (Ganz et coll., 1988). D'autres souffrent d'infections bactériennes orales fréquentes et de maladie parodontales graves qui se corrélient avec une insuffisance en

cathélicidine (LL-37) et en α -défensines (HNP1-3) (Pütsep et coll., 2002). La faible expression de LL-37, β -défensine humaine, dans des lésions de peau provoquées par une dermatite atopique coïncide avec une augmentation du risque d'infections (Ong et coll., 2002 et Nomura et coll., 2003). Réciproquement, l'expression de hBD-2 et hBD-3 est augmentée dans les cas de psoriasis (Harder et coll., 2005) et dans l'inflammation broncho-alvéolaire (Hiratsuka et coll., 2003 et Ross et coll., 2004). L'expression des cathélicidines (LL-37 et CRAMPE) dans des kératinocytes évolue avec l'infection (Dorschner et coll., 2001).

Chez des modèles de rongeur, les cathélicidines, administrés après l'infection bactérienne, contrôlent la charge bactérienne et empêchent la mortalité (Scott et coll., 2002 ; Giacometti et coll., 2004 et Fukumoto et coll., 2005). Ces observations sont conformes à l'implication de ces peptides cationiques dans la défense de l'hôte, mais elles ne permettent pas d'affirmer un rôle antimicrobien direct de ces peptides, un rôle immunomodulateur ou les deux en même temps. De plus, ces observations qui mettent en parallèle l'expression des cathélicidines et des défensines avec des états infectieux et inflammatoires, démontrent un rôle des peptides antimicrobiens dans la défense contre l'infection.

5- Action directe des PAMs sur les pathogènes

Les effets protecteurs des peptides ont été attribués, en partie, aux propriétés antimicrobiennes observées *in vitro* avec des peptides purifiés agissant contre des bactéries, des champignons, ou des virus (Hancock et coll., 2000 ; Zasloff, 2002 et Bader et coll., 2003). La plupart des peptides antimicrobiens actifs interagissent avec les membranes bactériennes, selon trois modèles différents décrits plus loin (Hancock et coll., 2002 et Zasloff, 2002). La perturbation des bicouches lipidiques de la membrane cytoplasmique génère des canaux perméables aux ions, provoquant ainsi la mort des cellules bactériennes. Cependant, un certain nombre de peptides antimicrobiens, y compris la polyphémusine, un peptide antimicrobien très efficace de crabe (Figure 18) (Zhang et coll., 2000), traversent la membrane (Hancock et coll., 2002) et induisent la mort par l'action sur une ou plusieurs cibles anioniques intracellulaires (Zhang et coll., 2000 ; Kragol et coll., 2001 ; Patrzykat et coll., 2002 et Hong et coll., 2003). Pratiquement toutes les cathélicidines et les défensines ont une activité antimicrobienne directe *in vitro* dans les conditions appropriées. Cependant, cette activité est souvent contrariée par les concentrations physiologiques de sel, d'ions monovalents et divalents et la présence du sérum (Bowdish et coll., 2005a). Même si quelques peptides sont présents sur les lieux de l'infection aux concentrations pour lesquels ils ont une

activité antimicrobienne, la plupart agissent *in vivo* par des moyens alternatifs en raison de leur faibles concentrations et de l'antagonisme du aux concentrations physiologiques en sels (par exemple sur les surfaces des muqueuses).

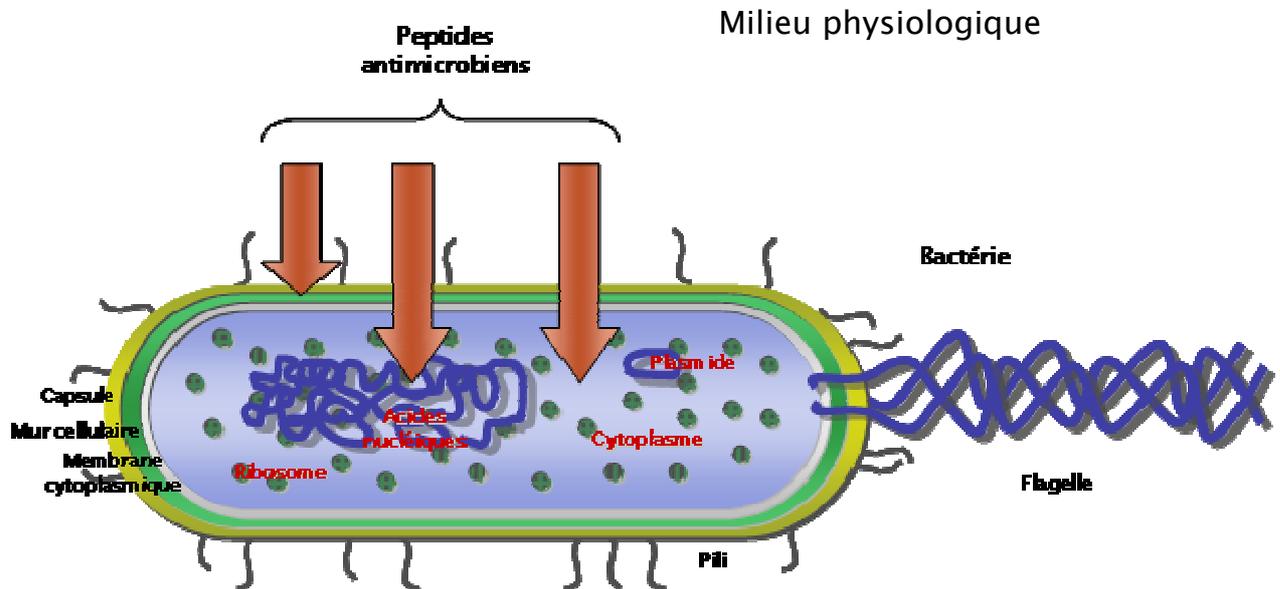


Figure 18 : Les cibles bactériennes des peptides antimicrobiens
Principales cibles de l'action directe des peptides antimicrobiens

6- Modulation du système immunitaire par les PAMs

Des résultats récents ont établi que, aux concentrations physiologiques de peptides, sels et sérum, les peptides antimicrobiens stimulent une large gamme d'effets biologiques liés à l'inflammation, l'immunité innée et l'immunité adaptative (Finlay et coll., 2004 ; Hiemstra et coll., 2004 ; Yang et coll., 2004 ; Selsted et coll., 2005 et Bowdish et coll., 2005a). Cette stimulation se produit par le biais des cellules de l'immunité innée (neutrophiles et cellules épithéliales) et des cellules grâce auxquelles le lien entre les systèmes immunitaires inné et adaptatif est possible (monocytes, macrophages et cellules dendritiques). Les peptides de mammifères favorisent, inhibent ou complètent les fonctions cellulaires telles que (Salzet, 2002a ; Finlay et coll., 2004 ; Hiemstra et coll., 2004 et Selsted et coll., 2005) :

- la chimiotaxie,
- l'apoptose,

- la transcription de gène,
- la production de cytokines.

De tels effets biologiques favoriseraient l'élimination des bactéries, même si ce n'est pas direct. De plus, les peptides auraient des rôles dans l'immunité au delà de l'activité antimicrobienne, en supprimant la production de cytokines (anti-inflammatoires) induites par les bactéries, et en stimulant la cicatrisation, l'angiogenèse et l'adjuvantité (capacité à modifier les réactions immunitaires, qui ont été démontrées chez les modèles animaux (Bowdish et coll., 2005b)).

7- Activation du système immunitaire par les PAMs

Les cathélicidines et les défensines sécrétées sur les lieux de l'infection ont un effet chimiotactique pour les cellules effectrices ; elles induisent également la transcription et la sécrétion des chimiokines ainsi que la libération d'histamine par les mastocytes (Figure 19) (Befus et coll., 1999 ; Niyonsaba et coll., 2001 et Niyonsaba et coll., 2002b). Ceci favorise le recrutement des cellules immunitaires nécessaires à la réponse cellulaire et humorale. Les α -défensines et les hBD-2, -3 et -4 ont un effet chimiotactique sur les monocytes, les cellules T et les CD8 immatures (Territo et coll., 1989 ; Chertov et coll., 1996 ; Yang et coll., 2000 et García et coll., 2001).

Les cathélicidines bovines, humaines, de souris et de porc ont un effet chimiotactique *in vitro* (Kurosaka et coll., 2005 et Bowdish et coll., 2005b) et *in vivo* (Ohgami et coll., 2003 et Kurosaka et coll., 2005) sur pratiquement tous les types de cellules sanguines périphériques. Par exemple, le LL-37 induit la libération d'IL-8 qui favorise à la fois le chimiotactisme des neutrophiles et la libération de concentrations élevées de LL-37. Un scénario semblable est observé chez les invertébrés : les hématies migrent par chimiotactisme vers les lieux de l'inflammation, où elles libèrent des peptides. Les PAMs stimulent également la libération de cytokines. Le LL-37 induit la libération d'IL-6, d'IL-8, de TNF- α , et d'IL-1 β chez les kératinocytes humains (Braff et coll., 2005) et augmente la sécrétion de TNF- α et IL-6 dans les cellules dendritiques immatures (Davidson et coll., 2004).

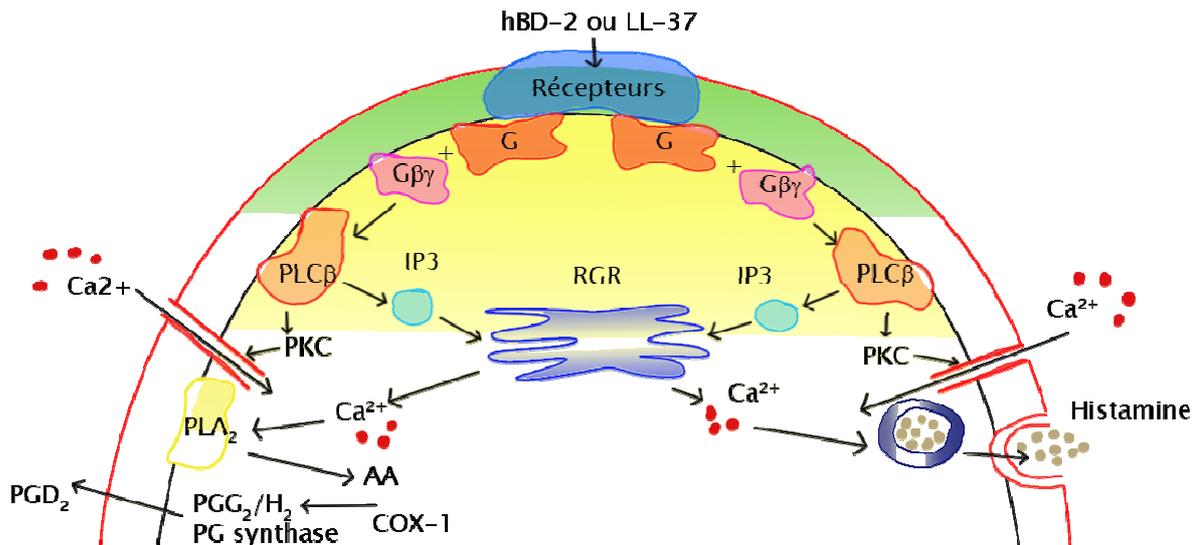


Figure 19 : Effets des peptides antimicrobiens hBD-2 ou LL-37 sur les mastocytes
Ce schéma illustre l'implication des PAMs dans l'inflammation, par activation de récepteurs membranaires, les PAMs permettent la libération d'histamine

8- Suppression de l'inflammation médiée par les PAMs

Bien que les peptides antimicrobiens de mammifères stimulent directement certaines fonctions de l'immunité innée, considérées comme proinflammatoires (telles que le chimiotactisme des leucocytes, et l'induction de la libération de cytokine, de chimiokine et d'histamine), les peptides protègent également l'hôte contre les effets nuisibles et potentiellement mortels qui résultent d'une réponse inflammatoire excessive induite par les TLRs (Scott et coll., 2002 et Mookherjee et coll., 2006). Ainsi, les cathélicidines suppriment la transcription des gènes des cytokines proinflammatoires (par exemple le TNF- α et l'IL-6) et la libération des médiateurs proinflammatoires induits par le LPS et d'autres produits bactériens. Les activités de neutralisation des endotoxines de ces peptides impliqueraient également les cathélicidines dans le maintien de l'homéostasie, en particulier dans certaines régions de l'intestin, et/ou en limitant l'inflammation aiguë. En outre, les cathélicidines inhibent la libération des composants toxiques qui détériorent les tissus et provoquent une inflammation aiguë, et favorisent activement la régénération tissulaire. Les cathélicidines et les défensines favorisent également la prolifération cellulaire, la vascularisation et la réparation des blessures (Murphy et coll., 1993 ; Aarbiou et coll., 2002 ; Aarbiou et coll.,

2004 et Chavakis et coll., 2004). Ces effets neutralisent et contrent les effets néfastes de l'inflammation.

9- Les PAMs comme adjuvants dans l'immunité

Les cathélicidines et les défensines agissent à l'interface entre l'immunité innée et adaptative (Yang et coll., 2004), en modulant la fonction des CD4 (Davidson et coll., 2004) et les réactions immunitaires spécifiques d'un antigène. Le LL-37 induit la différenciation des CD4, augmente la capacité d'endocytose, modifie l'expression des récepteurs et la fonction phagocytaire, augmente l'expression de CD86 et active la sécrétion de cytokine IL-12 par les CD4 stimulées par le LPS. De cette façon, les peptides antimicrobiens augmenteraient certains aspects de l'immunité adaptative, soutenant la différenciation de certaines lignées cellulaires et la possibilité de modifier les cytokines dans le milieu. L'IL-22 augmente l'expression de hBD-2 et -3 dans les kératinocytes (Wolk et coll., 2004), la libération d'IL-4 par les cellules Th2 et l'expression du CMH-I. Ces données laissent présager que l'expression (et sans doute la fonction) de ces peptides, est corrélées avec divers aspects de la réaction immunitaire adaptative. Utilisés comme des adjuvants, le LL-37, la CRAMPE et la BD-2 de souris sont capables d'augmenter les réponses humorales et cellulaires spécifiques d'un antigène (Biragyn et coll., 2002 ; An et coll., 2005 et Kurosaka et coll., 2005). Ces peptides seraient des adjuvants efficaces en raison de leur capacité à entraîner plusieurs réponses, dont le recrutement, la différenciation et l'activation des cellules effectrices sur les lieux de l'infection. Cependant, les effets de ces peptides sur la fonction lymphocytaire, sont encore mal décrits dans la littérature.

10- Mécanisme de la modulation de l'immunité par les PAMs

Les effets biologiques de ces peptides, de même que leur expression et leur sécrétion, sont souvent induits par les stimuli inflammatoires et sont influencés par l'environnement physiologique. La façon avec laquelle ces peptides exercent des effets immunomodulateurs implique de multiples mécanismes, y compris la liaison directe avec le LPS et des récepteurs de surface connus ou putatifs et/ou des molécules et des récepteurs de signalisation intracellulaires. Les cathélicidines sont capables :

- de se lier à une variété de récepteurs (Yang et coll., 2000 ; Niyonsaba et coll., 2002a ; Tjabringa et coll., 2003 ; Elssner et coll., 2004 et Lau et coll., 2005),
- d'activer des composants des voies de transduction du signal (Tjabringa et coll., 2003 ; Bowdish et coll., 2004 ; Kurosaka et coll., 2005 et Lau et coll., 2005),
- d'induire la mobilisation du Ca^{2+} (Niyonsaba et coll., 2001 et Kurosaka et coll., 2005),
- de se lier aux protéines contenant un domaine SH3 (Chan et coll., 1998 et Shi et coll., 1998),
- d'empêcher la translocation de NF κ B induite par le LPS (Gao et coll., 2000 et Mookherjee et coll., 2006).

Les interactions récepteur-ligand des cathélicidines ne sont pas encore bien comprises, et, seulement quelques fonctions dépendent de récepteurs connus (Yang et coll., 2000).

11- Conclusion

Il est de plus en plus évident que les peptides antimicrobiens participent activement à toutes les étapes de la défense immunitaire de l'hôte : soit directement en exerçant leur activité antimicrobienne, soit par la stimulation des fonctions biologiques des cellules immunitaires effectrices lors de la réaction immunitaire et inflammatoire, grâce à la communication avec les cellules jouant un rôle à l'interface entre le système immunitaire inné et adaptatif. Les PAMs sont également impliqués dans le contrôle et la résolution de la réponse inflammatoire.

IV- Modes d'action direct des peptides antimicrobiens

La majorité des peptides antibactériens interagissent avec la membrane en modifiant l'organisation de la bicouche phospholipidique, provoquant la perte de l'intégrité membranaire, d'où résulte la fuite du matériel intracellulaire menant à la lyse bactérienne. Actuellement, il y a trois modèles principaux pour expliquer la formation de pores induits par les peptides dans les bicouches lipidiques (Figure 20).

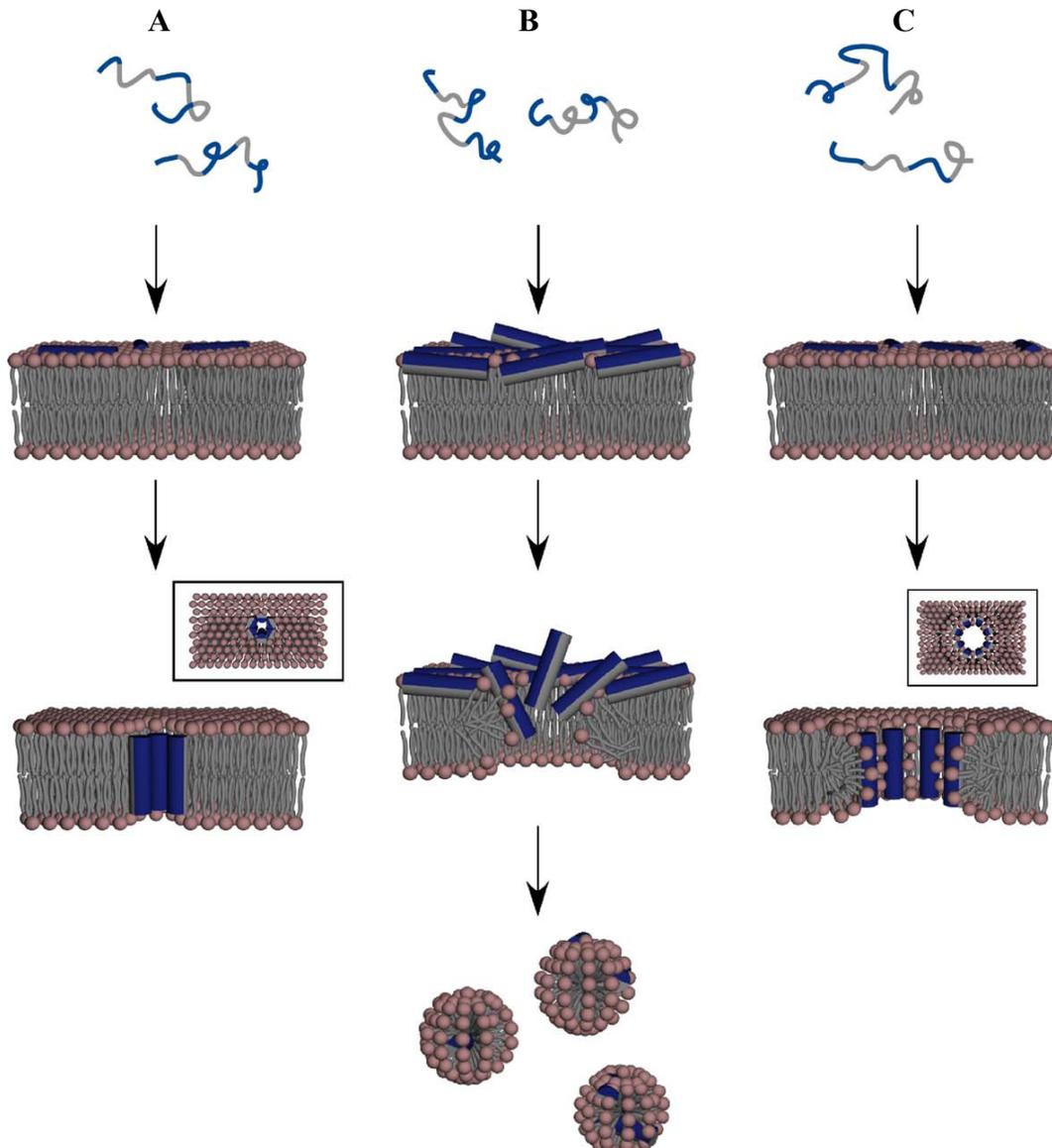


Figure 20 : Représentation des trois modèles principaux expliquant l'interaction des PAMs avec les membranes

A barrel-stave; B carpet-like; C toroïdal ou wormhole

1- Le modèle barrel-stave

Dans le modèle conventionnel *barrel-stave* (Ehrenstein et coll., 1977 et Ojcius et coll., 1991), les chaînes peptidiques sont orientées perpendiculairement à la surface membranaire. Tandis que leur face hydrophobe agit avec les chaînes apolaires des lipides, leur face hydrophile forme l'intérieur d'un pore constitué de plusieurs peptides.

2- Le modèle carpet-like

Dans le mécanisme *carpet-like* (Pouny et coll., 1992 ; Shai, 1995 et Shai, 1999), la réorientation des chaînes peptidiques est gênée par des interactions électrostatiques fortes entre les chaînes latérales chargées des peptides et les têtes souvent chargées négativement des lipides. L'accumulation des chaînes peptidiques à la surface de la membrane génère une tension entre les deux feuilletts de la bicouche, ce qui provoque la rupture de la membrane.

3- Le modèle toroïdal ou wormhole

Dans le modèle *toroïdal* ou *wormhole* (Ludtke et coll., 1996 et Huang, 2000), les chaînes peptidiques et les têtes lipidiques forment ensemble l'intérieur du pore. Bien que les chaînes peptidiques soient orientées perpendiculairement à la surface de la membrane, à cause de la réorientation des molécules lipidiques, elles restent à l'interface hydrophobe / hydrophile.

4- Autres modes d'action des peptides antimicrobiens

D'autres mécanismes d'action ont été décrits pour les PAMs. La séminale plasmine lyse les bactéries par activation des molécules de la cascade d'autolyse des cellules bactériennes (Shai, 1999). Les peptides PR-39 et l'apidaecine sont bactéricides mais pas bactériolytiques. Ils inhibent la synthèse protéique et induisent également la dégradation des protéines nécessaire à la réplication de l'ADN. Les protéines-1 des plaquettes, induites par la thrombine, et la défensine-1 des neutrophiles humains, sont des peptides cationiques qui affectent la structure et la fonction de la membrane cytoplasmique et qui sont impliqués dans l'inhibition de la synthèse protéique et de la synthèse d'ADN (Tossi et coll., 2000). L'attacine, inhibe la synthèse des protéines de la membrane externe sans entrer dans les cellules bactériennes (Hultmark et coll., 1983) tandis que la diptéricine augmente la perméabilité des membranes internes et externes d'*Escherichia coli* (Giacometti et coll., 1998).

V- Applications thérapeutiques des peptides antimicrobiens

1 – Introduction

Les similitudes fonctionnelles entre les peptides antimicrobiens d'espèces éloignées dans l'évolution, indiquent que ces peptides permettraient le développement de nouveaux modèles d'agents anti-infectieux chez l'homme (Zasloff, 2002 et McPhee et coll., 2005). Bien que peu étudiés jusqu'à présent, les effets immunomodulateurs de ces peptides (naturels ou synthétiques), y compris la neutralisation des LPS, l'induction de la transduction de signal, la transcription de gène (McPhee et coll., 2005) font l'objet d'un nombre croissant d'articles, et suscitent l'intérêt de diverses unités de recherche. Il est intéressant de développer ces peptides comme nouvel outil thérapeutique pour le traitement des maladies infectieuses humaines, grâce à leur capacité à amplifier sélectivement l'immunité innée (Bowdish et coll., 2005b). La redondance fonctionnelle entre les espèces, les activités antiseptiques et antimicrobiennes, les propriétés d'adjuvants et la faible toxicité en font des agents thérapeutiques séduisants (Hancock et coll., 2000 ; Hiemstra et coll., 2004 ; Zhang et coll., 2004 et McPhee et coll., 2005). De plus, des domaines fonctionnellement actifs localisés dans différentes régions des peptides, facilitent le développement de nouveaux peptides ayant des fonctions efficaces et spécifiques (Braff et coll., 2005 et Bowdish et coll., 2005b).

2 – Rôle des PAMs contre les pathogènes

Face à la résistance croissante des bactéries aux antibiotiques conventionnels, les peptides antimicrobiens ouvriraient la voie à une nouvelle classe d'agents antimicrobiens.

Les propriétés lytiques des PAMs en font des outils thérapeutiques puissants. La plupart de ces peptides présentent des effets antimicrobiens contre une large variété de bactéries à Gram+ et à Gram- (Hancock, 1997a et Elsbach, 2003). Des études ont rapporté une forte activité de la cécropine P1, de l'indolicidine et de la nisine contre *Pseudomonas aeruginosa* (Giacometti et coll., 1999). De plus, l'activité de ces peptides augmente lorsqu'ils sont utilisés en combinaison avec des antibiotiques classiques, tels que la polymyxine E et la clarithromycine. Les cathélicidines mammaliennes comme SMAP-29 et CAP-18 actives contre des bactéries et des levures orales (telles que les espèces *Fusobacterium* et *Candida*) présentent dès lors un grand intérêt (Guthmiller et coll., 2001). Des peptides antimicrobiens synthétiques (CAP : cationic antimicrobial peptides) ont été mis au point afin de lutter contre

les infections nosocomiales dues à l'action des *candidas* présents sous formes de biofilms (Burrows et coll., 2006)

Les PAMs ont aussi été testés contre de nombreux protozoaires. Des peptides modèles se sont avérés actifs contre les parasites *Plasmodium berghei* et *Plasmodium yoelii nigeriensis* (Arrighi et coll., 2002). Les dérivés propionyle et isobutyryle de K4S4, un dérivé du peptide dermaseptine, sont capables de tuer le parasite intra-érythrocytaire, *Plasmodium falciparum* (Dagan et coll., 2002).

Les PAMs présentent aussi une large variété d'activités contre les champignons. Les cécropines sont fongicides, ils sont actifs contre *Aspergillus* et *Fusarium* (DeLucca et coll., 1997). De même, les dermaseptines, qui sont des peptides antifongiques non hémolytiques, sont actives contre *Cryptococcus neoformans* (De Lucca et coll., 1999). La limenine, un peptide de la famille des défensines, est actif contre divers champignons tels que *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* et *Mycosphaerella arachidicola* (Wong et coll., 2006).

Certains peptides ont présenté des activités contre les virus et en particulier le VIH. Ainsi, les α -défensines humaines 1 à 3 contribuent à l'activité anti-VIH-1 des facteurs antiviraux sécrétés par les cellules T CD8 (Zhang et coll., 2002). NP-1, une défensine- α de lapin, empêche l'entrée et la dispersion intracellulaire du VIH-2, *in vitro* (Sinha et coll., 2003).

Cependant, ces données ne permettent pas encore de conclure sur la réelle efficacité thérapeutique des peptides antimicrobiens.

3- Rôle contraceptif et antitumoral

Au delà de leur action possible contre les pathogènes extérieurs, les peptides antimicrobiens peuvent être utilisés avec d'autres objectifs thérapeutiques. Ainsi, la magainine-A et la nisine ont la capacité d'inhiber la mobilité du sperme, de plus les magainines sont embryotoxiques, ces peptides pourraient être utilisés comme contraceptifs locaux (Reddy et coll., 1996 ; Reddy et coll., 2000 ; Mystkowska et coll., 2001 et Aranha et coll., 2004).

Les magainines, les cécropines, et les défensines des granulocytes humains ont également la capacité de lyser plusieurs types de cellules tumorales à des concentrations 5 à 10 fois plus basses que pour la lyse des cellules normales (Lichtenstein et coll., 1986 ; Jacob et coll., 1994 et Moore et coll., 1994). Ainsi, la magainine-2 et des analogues synthétiques des magainines peuvent exercer leur activité anti-tumorale envers des leucémies et des tumeurs

ovariennes spontanées, et cela à la fois *in vitro* et *in vivo* (Baker et coll., 1993). Enfin, l'expression de peptides antimicrobiens a été rapportée dans plusieurs lignées cellulaires tumorales où selon leurs concentrations, ils exercent soit une activité mitogénique, soit une activité nécrotique (Müller et coll., 2002).

A des concentrations identiques à celles requises pour les activités antimicrobiennes, les défensines stimulent la croissance des fibroblastes et des cellules épithéliales, *in vitro* (Murphy et coll., 1993). Ceci suggère que les défensines pourraient avoir un double rôle dans les blessures de la peau et des muqueuses. En plus de prévenir les infections microbiennes, elles augmenteraient la vitesse du processus de cicatrisation (Aarbiou et coll., 2002).

4- Une voie possible d'administration des PAMs

Une voie actuelle de recherche qui mettrait à profit l'action des peptides antimicrobiens directement sur les lieux de l'infection est d'insérer ces peptides dans des biomatériaux. En effet, la chirurgie, les techniques d'anesthésie et de réanimation impliquent souvent l'utilisation de dispositifs implantables (les implants) dans le but de remplacer une partie altérée du corps. Or, tout processus de contact entre un biomatériau et un tissu génère une cascade d'évènements, due à l'adsorption des protéines puis à l'adhésion de diverses cellules sur la surface du solide. Ces phénomènes initiaux se déroulant à l'interface sont essentiels car ils conditionnent l'adhésion de bactéries (van Loosdrecht et coll., 1990) mais également d'éléments cellulaires nécessaires à l'intégration du matériel. La protection de ces implants contre les microorganismes est capitale puisque les infections des matériaux implantés constituent l'une des raisons les plus sérieuses de complications postopératoires ; ce qui se vérifie en particulier pour les biomatériaux implantés dans un milieu septique tel que la cavité orale (ces implants sont généralement impliqués dans des restaurations prothétiques dentaires ou laryngiennes). Si de telles infections ne sont pas traitées, la formation d'un biofilm bactérien se développe à la surface des biomatériaux (Figure 21)(Costerton et coll., 1999 et Stewart et coll., 2001), ce qui peut générer une infection microbienne chronique, une inflammation et une nécrose tissulaire (Burns et coll., 1993 et Stickler et coll., 1995).

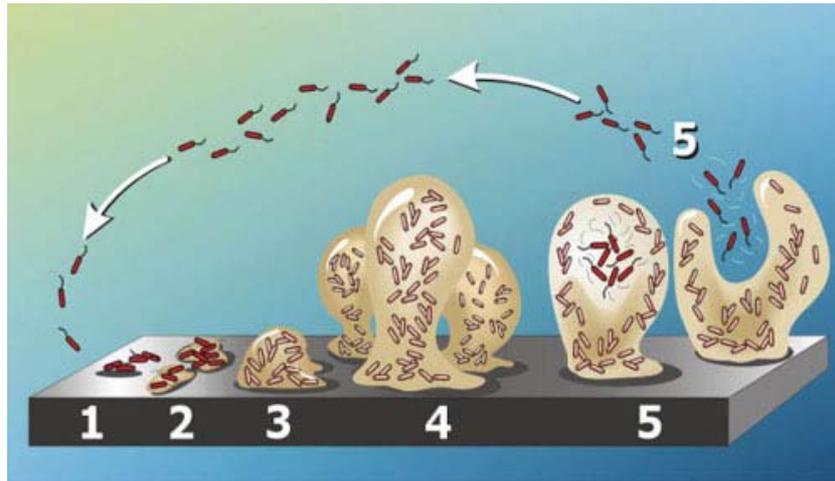


Figure 21 : Représentation schématique du développement d'un biofilm sur une surface
 La phase 1 est la phase de colonisation de la surface par les microorganismes, qui se développent (phases 2 à 4) pour atteindre la phase 5 correspondant à un biofilm mature

Ces infections sont plus fréquemment dues à des bactéries à Gram+, telle que *Staphylococcus epidermidis* (Rupp et coll., 1994) et *Staphylococcus aureus* (Barth et coll., 1989), plus rarement à des bactéries à Gram- comme *Escherichia coli* (Dankert et coll., 1986). En odontologie, les infections orales sont fréquentes, notamment chez les porteurs de prothèses complètes amovibles : 65 % de ces patients présentent des candidoses sous prothétiques (Budtz-Jørgensen, 1990). Ces infections sont des stomatites dues à une levure : *Candida albicans* qui se développe en biofilm fongique. Deux stratégies de traitement de surface sont habituellement étudiées : la première consiste à lutter contre l'adhésion bactérienne (Jansen et coll., 1988), la seconde, à éliminer ces agents pathogènes par l'incorporation de molécules antimicrobiennes (Pascual, 2002). Des peptides antimicrobiens peuvent ainsi être utilisés, comme il sera présenté dans le chapitre IV. En effet, KP Leung et son équipe ont montré qu'un peptide antimicrobien synthétique (KSL) peut être utilisé afin de lutter contre la formation de la plaque dentaire et même contre le biofilm mature (Leung et coll., 2005). Plusieurs sociétés poursuivent activement des recherches sur ces peptides en tant que nouvel outil thérapeutique antimicrobien. Migenix développe des essais cliniques de phase IIIb avec des peptides dérivés de l'indolicine et greffés sur des cathéters afin d'éviter les infections (Zhang et coll., 2004).

VI- Conclusion

Une analyse détaillée de la façon dont ces peptides participent à l'identification et à la neutralisation des pathogènes aidera au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques anti-infectieuses. Ces études sur les mécanismes d'action de ces peptides reposent sur des analyses structure-fonction qui permettront la connaissance de la modulation immunitaire. Ces études devront valider, *in vivo*, les fonctions de ces peptides qui protègent l'organisme contre l'infection bactérienne et suppriment les effets potentiellement nocifs de l'inflammation.

L'apparition de nouvelles maladies infectieuses et la présence incontrôlée des infections nosocomiales exige la découverte de molécules anti-infectieuses inédites contre lesquelles les microorganismes n'ont pas encore développé de résistance. Les peptides antimicrobiens non toxiques, spécifiques des microorganismes suscitent l'intérêt de nombreux chercheurs.

Depuis 1995 l'équipe *Neuropeptides bioactifs* a découvert et caractérisé de nouveaux peptides antimicrobiens dérivés principalement des chromogranines A et B. Ces protéines sont porteuses de nombreuses modifications post-traductionnelles qui modulent leur maturation, mais également les activités biologiques des peptides générés. Par ailleurs, ces protéines ubiquitaires aux multiples activités biologiques sont des marqueurs de pathologies neurodégénératives et de tumeurs. Parce que de récentes données bibliographiques les considèrent comme des acteurs privilégiés de la communication entre les systèmes neuroendocrine et immunitaire je vais présenter dans le chapitre suivant les propriétés structurales et biologiques de trois membres de la famille des granines (Les chromogranines A et B et la sécrétogranine II).

Chapitre IV : Les chromogranines / sécrétogranines

I- La famille des granines

Les chromogranines/sécrétogranines, qui composent la famille des granines, sont les composants majeurs de la matrice des granules de sécrétion. L'existence de ces protéines acides et solubles dans les granules de sécrétion a été révélée par N. Hillarp en 1958 (Hillarp, 1958). Le premier membre de cette famille a été identifié en 1965 comme composant exocytotique co-libéré avec les catécholamines par les glandes surrénales (Banks et coll., 1965). Lorsque la libération de cette protéine par la glande surrénale de veau a été établie *in vivo*, le terme *chromogranine* a été introduit par H. Blaschko (Blaschko et coll., 1967). Dès lors, cette famille de protéines acides a été associée au stockage et à la libération d'une grande variété d'hormones. En 1985, un second membre de cette famille a été caractérisé : la chromogranine B (CGB) (Falkensammer et coll., 1985 ; Fischer-Colbrie et coll., 1985a et Fischer-Colbrie et coll., 1985a). Aujourd'hui, cette famille, comprend sept membres : la chromogranine A (CGA), la chromogranine B (CGB), la sécrétogranine II (SgII), la sécrétogranine III / antigène 1B1075 (SgIII), la sécrétogranine IV / antigène HISL-19 (SgIV), la sécrétogranine V / 7B2 (SgV) et la NESP55 (Neuroendocrine Secretory Protein 55).

Les chromogranines sont très bien conservées au cours de l'évolution ; en effet, elles sont présentes dans de nombreuses espèces de mammifères, mais aussi les poissons, les reptiles, les arthropodes, les mollusques...(Rieker et coll., 1988 ; Reinecke et coll., 1991 ; Reinecke et coll., 1993 et D'Este et coll., 1995).

Les chromogranines sont des protéines possédant plusieurs sites dibasiques qui représentent des sites potentiels de clivage protéolytique permettant de générer de nombreux peptides dérivés.

II- Localisation des chromogranines

Les membres de la famille des chromogranines sont co-localisés avec des hormones peptidiques, des neuropeptides et des neurotransmetteurs au niveau de la matrice des granules de sécrétion de nombreuses cellules endocrines, neuroendocrines et neuronales.

Les chromogranines sont présentes en grande quantité dans les granules de sécrétion, dits à *cœur dense aux électrons*, des cellules dérivant de la crête neurale (Le Douarin 1980). Au niveau des neurones, les chromogranines sont stockées dans des vésicules de grande taille nommées *vésicules à cœur dense* (Large Dense Core Vesicles ; LCDVs).

Plusieurs études ont prouvé la présence ubiquitaire des chromogranines dans le système neuroendocrine (O'Connor, 1983 et Fischer-Colbrie et coll., 1985a). Les chromogranines sont présentes dans :

- la glande parathyroïdienne (Cohn et coll., 1982),
- les cellules C de la thyroïde (O'Connor, 1983),
- le pancréas endocrine (Yoshie et coll., 1987),
- l'adénohypophyse (O'Connor, 1983),
- les neurones du système nerveux central (Somogyi et coll., 1984).

Par ailleurs, de nombreuses cellules peptidergiques de la muqueuse du tractus gastro-intestinal présentent également une immunoréactivité marquée pour les chromogranines (Grube et coll., 1986 et Gauweiler et coll., 1988), notamment dans les cellules entérochromaffines de rat (Håkanson et coll., 1995) et d'origine humaine (Cubeddu et coll., 1995) (Tableau VI).

Tableau VI : Comparaison de la localisation tissulaire de la CGA, CGB et SgII

CGA	CGB	SgII
Glande surrénale Neurones sympathiques Hypophyse Pancréas Glande parathyroïde Estomac Intestins Cerveau Neutrophiles polymorphonucléaires	Glande surrénale Neurones sympathiques Hypophyse Pancréas Glande parathyroïde Cerveau	Glande surrénale Hypophyse antérieure Pancréas endocrine Intestins Nerfs sensitifs Hypothalamus

La CGA et la CGB ont été découvertes au niveau de la membrane et de la matrice des granules de sécrétion des cellules chromaffines bovines, où elles représentent respectivement 40 % et 10 % du matériel cytoplasmique soluble. La SgII ne représente que 2 % du matériel protéique intragranulaire total (Fischer-Colbrie et coll., 1986b). Il apparaît que les proportions relatives de CGA, CGB et SgII varient selon les espèces et les types cellulaires. Par exemple, dans les cellules chromaffines, la CGA est dominante chez le bœuf, le mouton et le cheval, alors que la CGB domine chez l'homme, le rat et la grenouille (Tableau VII). En plus de leur localisation dans les tissus endocrine, les chromogranines et leurs peptides dérivés sont

présents également dans une large variété de cellules immunitaires qui les libèrent dans les fluides infectieux (Metz-Boutigue et coll., 2003a).

La CGA, de même que la CGB, jouent un rôle important dans la mobilisation intracellulaire du Ca^{2+} dépendant de l'inositol 1.4.5-triphosphate. Les chromogranines sont au centre de l'homéostasie du calcium intracellulaire dans les cellules sécrétrices, ce qui peut s'expliquer par leur localisation intracellulaire. En effet, 95 % de la CGA est intragranulaire et les 5 % restant se situent dans le réticulum endoplasmique, tandis que la CGB est présente à 57 % dans les granules de sécrétion, 24 % dans le réticulum endoplasmique et 19 % dans le noyau (Huh et coll., 2005).

Tableau VII : Distribution des chromogranines dans les cellules chromaffines de différentes espèces (Fischer-Colbrie et coll., 1987)

Bœuf	CGA>>CGB>>SgII
Homme	CGB>CGA>SgII
Rat	CGB>>CGA>SgII
Mouton	CGA>>CGB>>SgII
Porc	CGA=CGB>>SgII
Cheval	CGA>CGB
Grenouille	CGB>>CGA=SgII

III- Modifications post-traductionnelles des chromogranines

Après leur synthèse, les chromogranines font l'objet de nombreuses modifications post-traductionnelles durant leur transport dans la voie de sécrétion. La formation de ponts disulfures et les N-glycosylations s'effectuent au niveau du réticulum endoplasmique rugueux tandis que les O-glycosylations, phosphorylations, sulfatations et oxydations ont lieu dans l'appareil de Golgi. Lors de leur stockage dans les granules de sécrétion, les chromogranines subissent l'action d'enzymes protéolytiques (en particulier les prohormones convertases) qui vont les cliver pour générer des peptides actifs. Ces clivages protéolytiques ont lieu également dans la circulation sanguine, après sécrétion (Helle, 2004).

IV- Fonctions biologiques des chromogranines

Les chromogranines ont la capacité de s'agréger entre elles, mais également de s'associer avec d'autres molécules telles que les catécholamines (Westermann et coll., 1988 et Videen et coll., 1992), la sérotonine (Bargsten et coll., 1992), l'histamine (Watkinson et coll., 1992), l'ATP (Yoo et coll., 1990) ou l'hormone parathyroïdienne (Gorr et coll., 1989). Ce phénomène d'agrégation entraîne la formation d'un cœur dense qui exclut les protéines de la voie de sécrétion constitutive et permet l'empaquetage des neurotransmetteurs et diverses hormones dans les granules de sécrétion. Lors de l'exocytose, l'agrégation du matériel atteint des concentrations locales de molécules suffisantes pour entraîner les effets biologiques (Helle, 2004).

Dès 1987, il a été suggéré que les chromogranines modulent la maturation protéolytique des hormones et neuropeptides en servant de substrats compétitifs aux enzymes protéolytiques intra- et extracellulaires (Seidah et coll., 1987).

Enfin, les chromogranines sont les précurseurs de nombreux peptides à activité biologique. Une grande part des fonctions biologiques assurées par les chromogranines sont dues à l'action de leurs peptides dérivés (Tableau VIII). La découverte, en 1986 (Tatemoto et coll., 1986), du premier peptide actif dérivé de la CGA a donné naissance au concept de prohormone (Eiden et coll., 1987). Il est désormais reconnu que chaque chromogranine est maturée différemment en fonction des espèces et des tissus afin de donner naissance à une large gamme de peptides aux activités biologiques diverses.

V- La chromogranine A et la chromogranine B

Parce que la CGA est la protéine la plus étudiée appartenant à la famille des chromogranines/sécrétogranines, j'ai choisi de réactualiser les connaissances de cette protéine à la lumière des données les plus récentes.

Moins étudiée que la CGA, la CGB présente beaucoup d'homologies structurales et fonctionnelles avec cette protéine essentielle des granules de sécrétion des cellules chromaffines. De plus, étant majoritaire dans la glande surrénale humaine, son étude peut présenter des retombées cliniques.

La CGA est un bon modèle dans la recherche des fonctions des chromogranines du fait de son homologie avec la CGB (Figure 22). C'est pourquoi la littérature concernant la CGA est plus abondante. Dans ce chapitre, je vais mettre en parallèle les connaissances récemment accumulées sur ces deux chromogranines.

1 – Structure primaire des chromogranines

a- La CGA

Les régions N- et C-terminales de la CGA sont fortement conservées entre les espèces (Figure 23).

La CGA, purifiée à partir des granules chromaffines de la médullo-surrénale bovine, a un poids moléculaire apparent estimé par électrophorèse SDS-PAGE à 70 kDa alors que son poids moléculaire réel, calculé à partir de la séquence primaire de la protéine mature, est de 48 kDa (Tableau VIII). La différence entre le poids moléculaire apparent et le poids moléculaire réel résulte de modifications post-traductionnelles, c'est-à-dire de glycosylations et de phosphorylations, ainsi que du nombre élevé de résidus acides (21 % d'acide glutamique et d'acide aspartique). La CGA a été décrite comme étant O-glycosylée avec des di- ou trisaccharides (Kiang et coll., 1982) et phosphorylée (Settleman et coll., 1985). Les sites des modifications post-traductionnelles ont été plus précisément localisés et structurellement identifiés, par notre laboratoire, en utilisant un panel de techniques d'analyses protéomiques : digestions enzymatiques, séparation par HPLC (High Performance Liquid Chromatography), microséquençage de protéines selon la méthode d'Edman et spectrométrie de masse (MALDI-TOF) (Strub et coll., 1997).

Sept sites de modifications post-traductionnelles ont été mis en évidence : deux O-glycosylation et cinq sites de phosphorylation. Les O-glycosylation consistent en un trisaccharide NeuAc α 2-3Gal β 1-3GalNAc α 1. Elles sont situées au centre de la protéine sur la Ser₁₈₆ et la Thr₂₃₁ (Strub et coll., 1997). La partie glycanique sur la Ser₁₈₆ est incluse dans un peptide antibactérien nommé chromacine (Strub et coll., 1996b). Quatre sites de phosphorylation sont présents sur des résidus sérine en position Ser₈₁, Ser₃₀₇,

Tableau VIII : Propriétés physico-chimiques des chromogranines/sécrétogranines

Mt : masse moléculaire théorique, O-G : O glycosylations, N-G : N glycosylations, P : phosphorylations, S : sulfatations

		Chromo- some	Nombre de résidus	Mt (kDa)	pI	Thermo- stabilité	Peptides	Pont S-S	Liaison avec	O-G	N-G	P	S	Références
CGA	Homme	14	439	49	4.5	++	Vasostatine-I, Vasostatine-II, Chromofungine, Chromostatine, Chromacine, Pancréastatine, WE-14, Catestatine	+	SgIII Plasmi- nogène Ca ²⁺	++	-	+	+	(Seidah et coll., 1983 ; Hutton et coll., 1985 ; Benedum et coll., 1986 ; Krisch et coll., 1986 ;
	Bœuf	21	431	48	4.7									
	Rat	6	448	51	4.6									
	Souris	12	445	50	4.6									
CGB	Homme	20	657	76	5	++	GAWK peptide, Peptide BAM- 1745, Sécrétolytine, peptide CCB	+	IP3R Ca ²⁺	++	+	++	+	Benedum et coll., 1987 ; Konecki et coll., 1987 ; Gerdes et coll., 1988 ; Forss-Petter et coll., 1989 ;
	Bœuf	13	626	71	5.2									
	Rat	3	655	75	4.9									
	Souris	2	657	76	5.1									
SgII	Homme	2	590	68	4.7	++	Sécréto- neurine, mansérine, EM- 66, AMENM	-	Ca ²⁺	-	-	+	+	Gerdes et coll., 1989 ; Mbikay et coll., 1989 ; Fischer-Colbrie et coll., 1990 ; Flanagan et coll., 1990 ;
	Bœuf	2	586	67	4.7									
	Rat	9	589	68	4.7									
	Souris	1	587	68	4.7									
SgIII (1B1075)	Homme	15	449	51	4.9	ND		-	CGA CPE Ca ²⁺	ND	-	ND	ND	Linard et coll., 1990 ; Ottiger et coll., 1990 ; Waldbieser et coll., 1991 ;
	Bœuf	ND	ND	ND	ND									
	Rat	18	449	57	4.9									
	Souris	9	449	51	4.8									
SgIV (HISL-19)	Homme	ND	ND	35	5.6	ND		ND	ND	ND	-	ND	ND	Wu et coll., 1991 ;
	Bœuf													
	Rat													
	Souris													
SgV (7B2)	Homme	15	186	21	5.5	++	7B2 ₁₋₁₃₅ 7B2 ₁₅₅₋₁₈₅	-	PCSK2 GTP Ca ²⁺	ND	-	+	+	Schimmel et coll., 1992 ; Dopazo et coll., 1993 ; Ischia et coll., 1997 ;
	Bœuf	ND	ND	ND	ND									
	Rat	3	186	21	5.5									
	Souris	2	186	21	5.5									
SgVI (NESP 55)	Homme	20	245	28	5.3	++	NESP 55 ₁₅₉₋₁₆₂	-	AVR2 GlucR PD2R LHR B3AR CRHR GNBP	+	-	+	ND	Hayward et coll., 1998 ; Hayward et coll., 1998 ; Song et coll., 1998 et Weiss et coll., 2000)
	Bœuf	13	241	27	5									
	Rat	3	256	29	5									
	Souris	2	253	29	5									

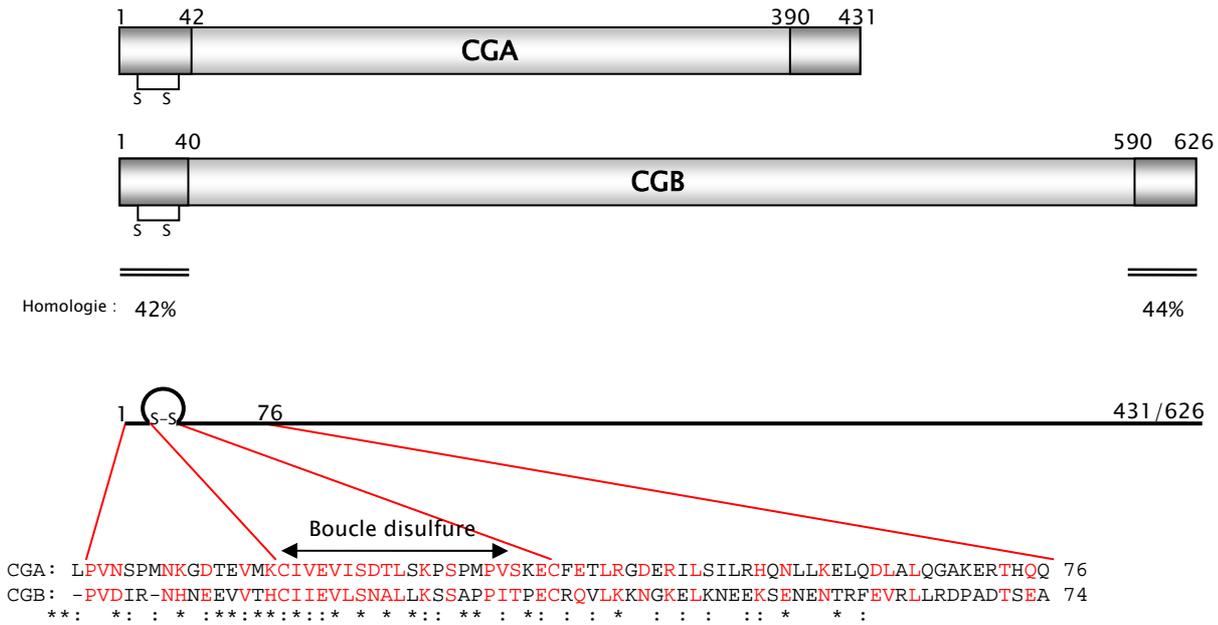


Figure 22 : Homologie de séquence entre la CGA et la CGB bovine

Les séquences N et C-terminales des chromogranines A et B présentent une forte homologie de séquence (42 et 44%). La région médiane de ces protéines est plus variable. La comparaison de séquences dans le domaine 1-76 montre une conservation importante au niveau de la boucle disulfure (* : acides aminés identiques, : : acides aminés de même nature)

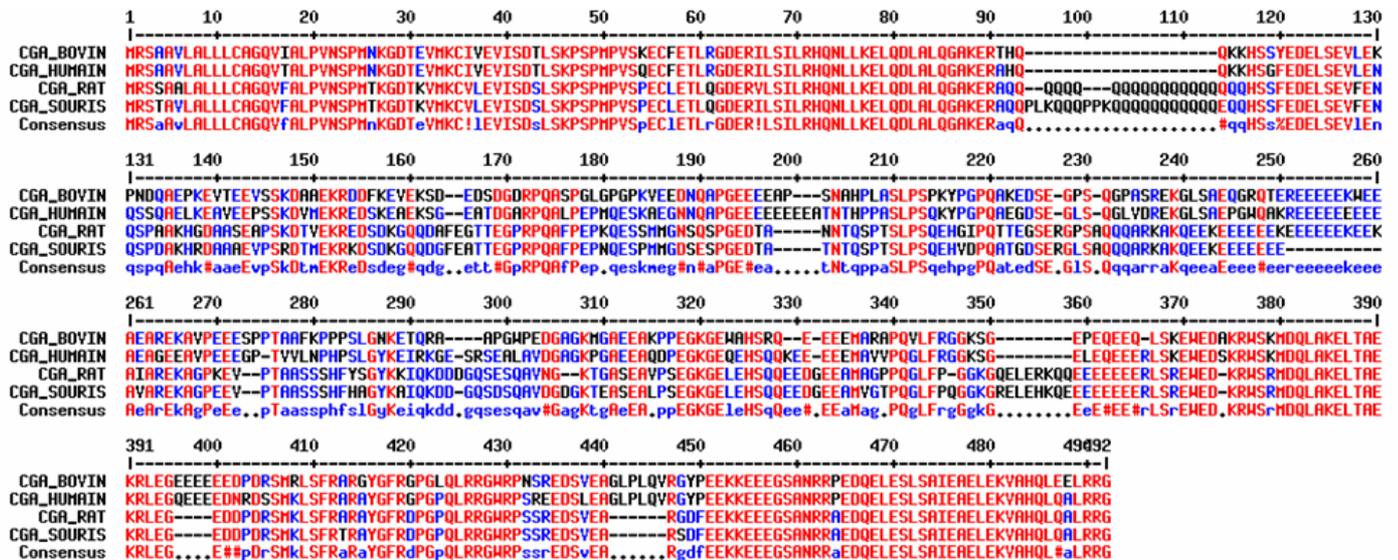


Figure 23 : Alignement des séquences de CGA de bœuf, homme, rat et souris

Les régions N- et C-terminales sont très bien conservées (en rouge : les acides aminés identiques, en bleu, les acides aminés de même nature)

Ser372 et Ser376 et un cinquième est localisé sur le résidu Tyr173 (Figure 24). Il est intéressant de noter qu'aucune modification n'est présente dans le domaine N-terminal de la CGA. Ceci a été confirmé par des études de structure du peptide CGA₁₋₇₆ purifié à partir de granules chromaffines bovins à l'aide d'un spectromètre de masse (MALDI-TOF) (Lugardon et coll., 2000). Deux sites d'O-glycosylation et cinq sites de phosphorylation ont été également confirmés chez le porc (Bauer et coll., 1999).

Les deux glycanes situés dans la partie centrale de la CGA la protège contre les attaques protéolytiques qui se produisent principalement et de façon récurrente sur les extrémités N- et C-terminales (Metz-Boutigue et coll., 1993).

Les sites portant les modifications post-traductionnelles sur la CGA bovine sont très conservés chez les mammifères (l'homme, le porc, le rat et la souris) (Strub et coll., 1996b) mis à part le résidu Tyr₁₇₃ qui est uniquement présent dans les séquences bovine et humaine. Concernant les mécanismes enzymatiques impliqués dans la phosphorylation de la CGA, plusieurs études ont été rapportées. Une analyse de séquence révèle que de nombreux sites seraient phosphorylés par une kinase dépendante du GMPc (Ser₈₁), une kinase dépendante de l'AMPc (Ser₃₀₇, Ser₃₇₂, Ser₃₇₆) et/ou une protéine kinase C (Ser₈₁, Ser₃₇₂, Ser₃₇₆). Il n'y a qu'une seule étude suggérant que les phosphorylations de la CGA dans les cellules chromaffines en cultures sont directement liées à l'activité sécrétrice de ces cellules (Yanagihara et coll., 1996).

En 1998, P Gadroy et coll., ont utilisé les urines de patients atteints de tumeurs carcinoïdes, ce qui leur a permis de caractériser la présence de modifications post-traductionnelles spécifiques des patients malades (Gadroy et coll., 1998). Six modifications ont été mises en évidence : trois O-glycosylations sont localisées au centre de la protéine en position Thr₁₆₃, Thr₁₆₅ et Thr₂₂₃ et trois phosphorylations sont situées dans le domaine central et le domaine C-terminal sur les résidus Ser₂₀₀, Ser₂₅₂ et Ser₃₁₅. Les glycanes sont variables d'un site à l'autre et se composent de di-, tri- et tétrasaccharides, ce qui est corroboré par l'observation suivante : la structure des glycanes sur la protéine humaine d'origine tumorale (GalNAc α -1 et Gal β 1-3GalNAc α -1) correspond aux antigènes T et Tn présents sur les glycoprotéines d'origine tumorale. Ces glycanes présents sur la CGA tumorale sont supposés exercer une protection spécifique contre la dégradation et induire la genèse de fragments qui ne sont pas produits dans les tissus sains. Les sites de phosphorylation divergent de ceux observés sur les séquences conservées de la CGA bovine.

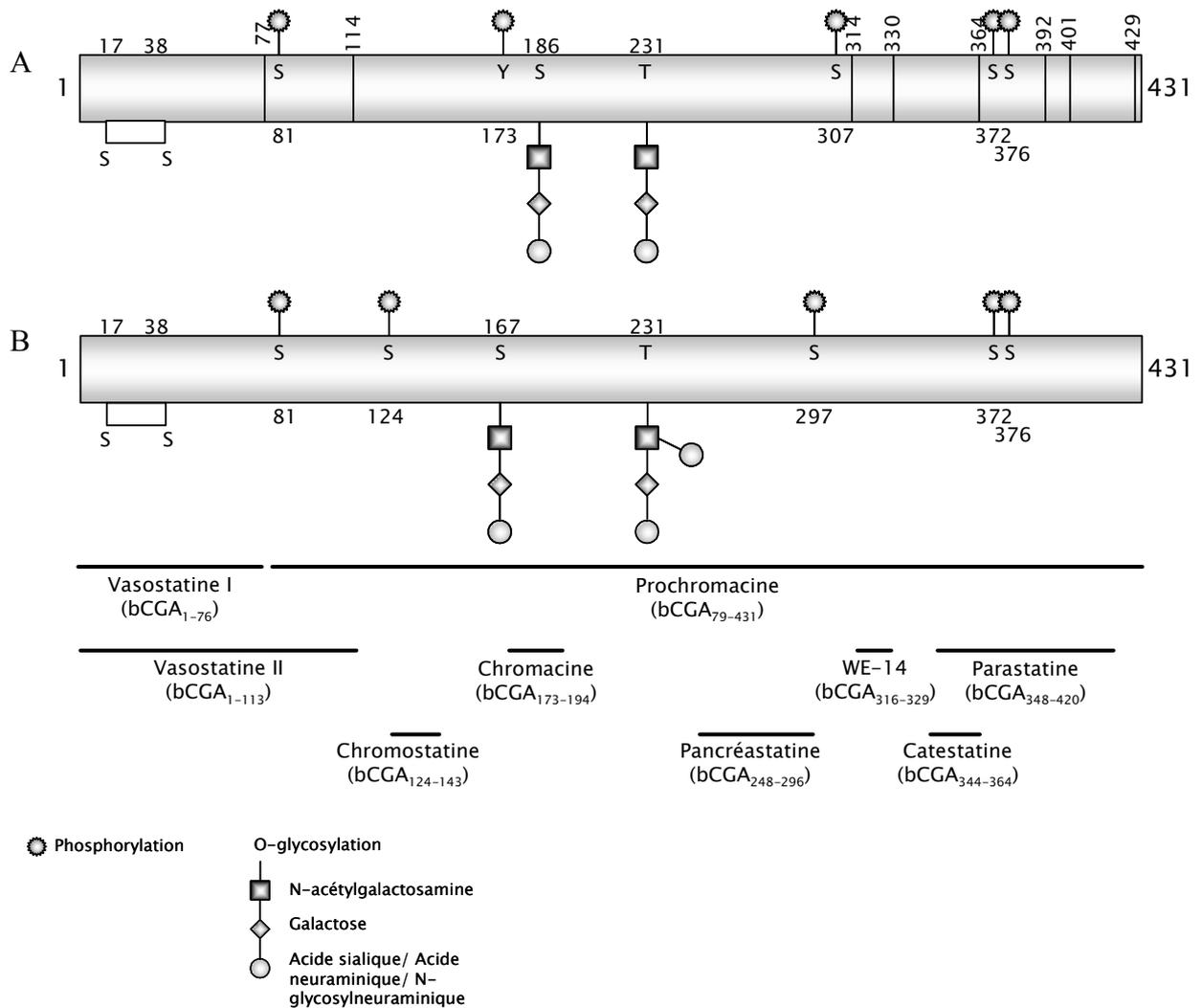


Figure 24 : Localisation sur la séquence de la CGA des modifications post-traductionnelles et des peptides actifs
 (A) : d'après (Strub et coll., 1997), (B) : d'après (Bauer et coll., 1999)

b- La CGB

La chromogranine B bovine a été identifiée pour la première fois en 1985 (Fischer-Colbrie et coll., 1985a), mais sa séquence primaire n'a été décrite chez le bœuf qu'en 1991 (Bauer et coll., 1991) et chez l'homme qu'en 1987 (Benedum et coll., 1987). La CGB bovine présente 626 résidus et un point isoélectrique de 5,2. La différence entre le poids moléculaire théorique (76 kDa) et la valeur estimée par électrophorèse sur gel SDS-PAGE (100 kDa) résulte, comme pour la CGA, de la présence de nombreuses modifications post-traductionnelles (glycosylations (Kiang et coll., 1982), phosphorylations (Rosa et coll., 1985) et sulfatations (Falkensammer et coll., 1985)) et de l'abondance de résidus acides (24 %) (Tableau VIII).

La région N-terminale de la CGB, très bien conservée au cours de l'évolution (Figure 25) est porteuse d'un pont disulfure nécessaire à l'interaction de la CGB avec les membranes du réseau trans-golgien (Glombik et coll., 1999).

La structure primaire de la CGB humaine contient 15 paires d'acides aminés basiques (Figure 26), qui sont des sites potentiels pour le clivage par des protéases endogènes spécifiques. Plusieurs peptides de la CGB ont été identifiés dans des extraits tissulaires d'hypophyse humains, de phéochromocytomes humains, de cerveaux de rat, de liquide cébrospinal humain, dans le nerf splanchnique de porc (Benjannet et coll., 1987 ; Conlon et coll., 1992 ; Marksteiner et coll., 1999 ; Stark et coll., 2001 et Depreitere et coll., 2002).

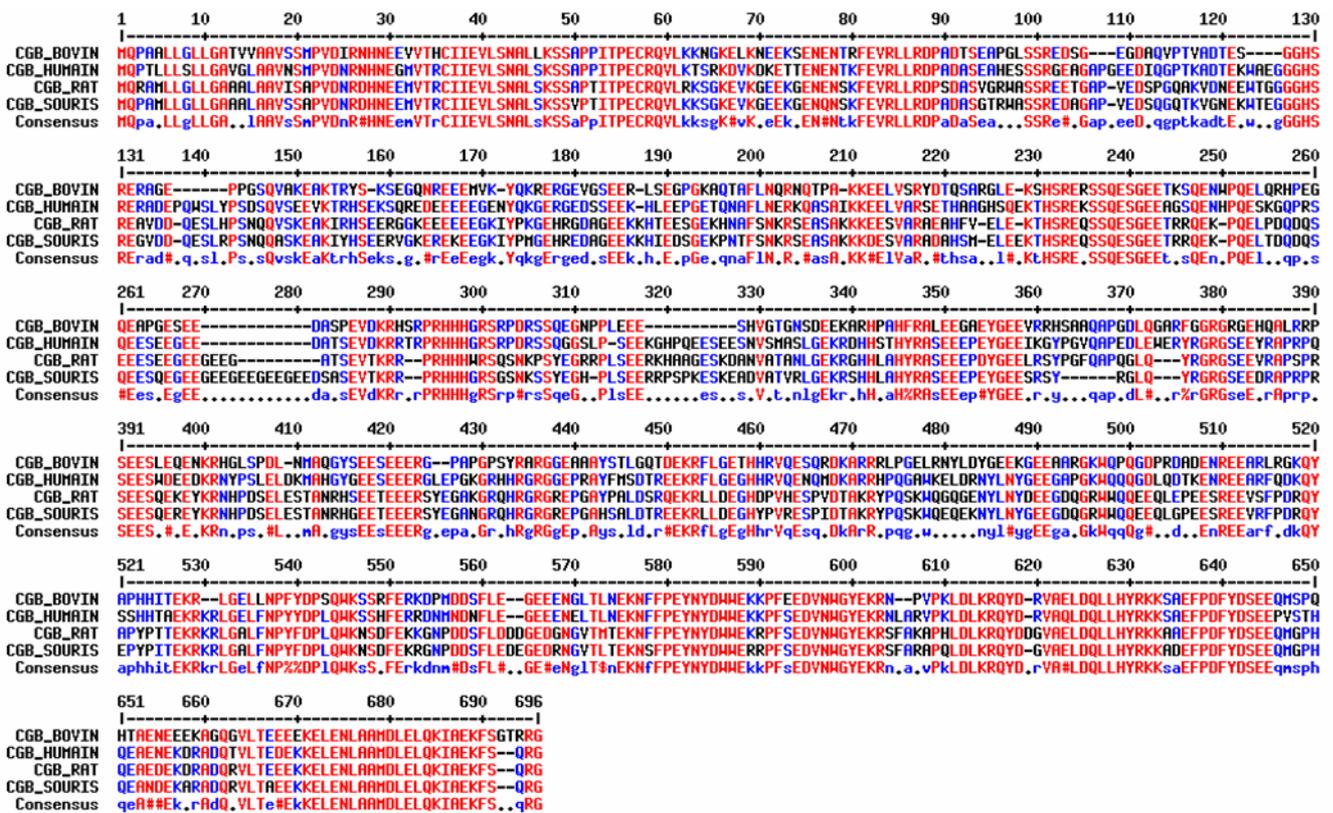


Figure 25 : Alignement des séquences de CGB de bœuf, homme, rat et souris

Les régions N- et C-terminales sont très conservées (en rouge : les acides aminés identiques, en bleu, les acides aminés de même nature)

A l'heure actuelle, peu de travaux concernent la localisation des modifications post-traductionnelles de la CGB. La CGB est connue pour porter des modifications post-traductionnelles telles que des glycosylations (Kiang et coll., 1982), phosphorylations (Rosa et coll., 1985) et sulfatations (Falkensammer et coll., 1985). Deux phosphorylations ont été localisées dans la région C-terminale de la CGB porcine (Wang et coll., 2001). La région N-terminale est connue pour être porteuse d'un pont disulfure (Lazure et coll., 1990).

2- Les peptides dérivés des chromogranines

a- La CGA

La CGA est considérée comme une prohormone générant un certain nombre de peptides actifs, qui sont très bien conservés au cours de l'évolution (Tableau IX)

La découverte de la pancréastatine, un peptide dérivé de la CGA, a ouvert la voie à l'hypothèse selon laquelle la CGA serait le précurseur de peptides bioactifs et serait considérée comme une prohormone (Eiden et coll., 1987 ; Huttner et coll., 1987b ; Simon et coll., 1989 et Helle et coll., 1994). Des peptides issus de la maturation protéolytique de la CGA ont été purifiés et caractérisés dans de nombreux tissus. Des fonctions biologiques sont attribués à plusieurs.

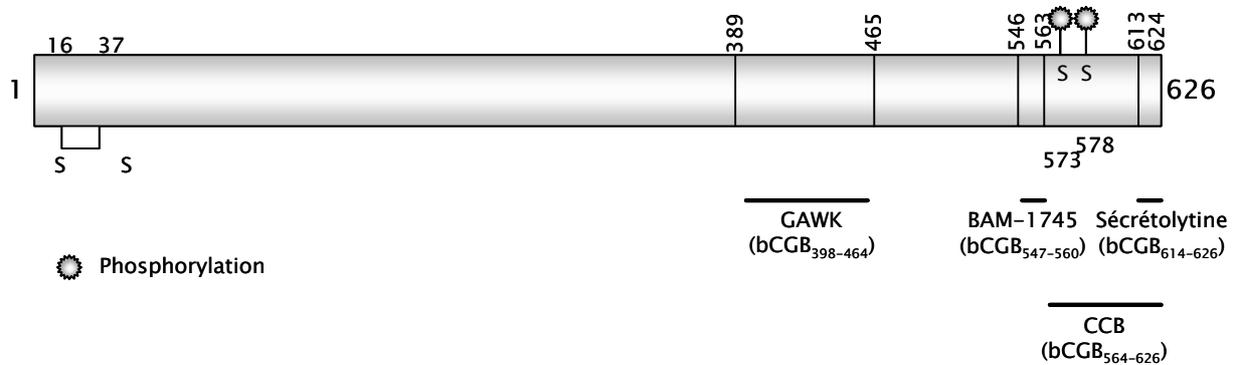


Figure 26 : Localisation sur la séquence de la CGB de ses modifications post-traductionnelles et de ses peptides actifs (Lazure et coll., 1990 et Wang et coll., 2001)

Tableau IX : Pourcentage d'homologie entre la séquence des différents peptides de CGA par rapport à la séquence de bœuf

	Vasostatine I 1-76	Vasostatine II 1-113	Chromostatine 124-143	Chromacine 173-194	Pancréastatine 248-296	WE14 316-329	Catestatine 344-364	Parastatine 348-420	CGA entière 1-431
Bœuf	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Homme	97%	88%	65%	67%	77%	100%	85%	92%	76%
Rat	86%	68%	44%	46%	41%	93%	81%	82%	58%
Souris	86%	63%	32%	49%	41%	93%	76%	80%	56%

✓ *Les vasostatines I et II*

La CGA donne naissance à des fragments situés dans son domaine N-terminal. Les vasostatines I (CGAb₁₋₇₆) et II (CGAb₁₋₁₁₃) (Figure 27Figure 28) antagonisent la contraction des muscles lisses médiée par l'endothéline dans certaines régions vasculaires (Aardal et coll., 1993). De ce fait, la vasostatine serait un nouveau peptide cardiorégulateur chez les mammifères (Cerra et coll., 2006). Les vasostatines inhibent les performances cardiaques basales et s'opposent à l'inotropisme positif adrénérgique. L'adhésion des fibroblastes stimulés par la vasostatine-I fait aussi partie de la réponse myocardique suite à une crise cardiaque. Ces peptides auraient un rôle cardio-régulateur (Corti et coll., 2004). La vasostatine I exerce une action inotropique négative sur le cœur d'anguille (Imbrogno et coll., 2004). Toujours en relation avec son action sur les muscles lisses, la vasostatine I inhibe les contractions spontanées des muscles circulaires du colon proximal de rat, par un mécanisme impliquant la libération de NO par le système nerveux (Amato et coll., 2005). Les vasostatines sont apparues comme liées à la réponse immunitaire dans le cerveau où elles permettent d'activer les cellules microgliales quiescentes (Ciesielski-Treska et coll., 1998). L'ensemble des activités inhibitrices de la vasostatine I serait expliquée par les capacités de ce peptide à perturber le microenvironnement lipidique des membranes. En effet, la vasostatine I et le peptide CGA₄₋₇₆, à des concentrations de 5-10 nM, ont des interactions à la fois électrostatiques et hydrophobes avec les phospholipides des membranes dans les conditions physiologiques ; la vasostatine I, en particulier, augmente la fluidité des membranes saturées en phosphatidylsérine (Blois et coll., 2006).

Deux peptides issus de la vasostatine I, le peptide CGA₄₋₁₆ et le peptide CGA₄₇₋₆₆, ont été décrits comme ayant des rôles dans la réponse nociceptive induite par l'acide acétique chez le rat et par conséquent ayant une activité modulatrice dans la douleur inflammatoire (Ghia et coll., 2004b). Pour la première fois, il a été montré qu'un fragment de CGA, CGA₄₇₋₆₆, possède des effets antinociceptifs efficaces à de faibles doses. Bien que le mécanisme déclenché par ce peptide soit inconnu, les auteurs supposent une implication des récepteurs du CRF (Ghia et coll., 2004a). De plus, *in vitro*, la CGA₄₋₁₆ aurait un rôle protecteur ; elle préviendrait l'inhibition de la motilité intestinale due à l'acide acétique en agissant à la fois sur les muscles lisses et les terminaisons afférentes (Ghia et coll., 2004 et Jean-Eric et coll., 2005).

Par ailleurs, la vasostatine I présente des propriétés antimicrobiennes (Lugardon et coll., 2000 et Lugardon et coll., 2001). Elle est capable de tuer les bactéries à Gram+ aussi

bien qu'une large variété de champignons et de levures, sans pour autant partager d'homologies structurales avec les classes connues de peptides antibactériens.

CGA₁ LPVNSPMNKG DTEVMKCIVE VISDTLSKPS PMPVSKECFE TLRGDERILS ILRHQNLLKE
LQDLALQGAK ERTTHQQ₇₆

Figure 27: Séquence de la vasostatine I bovine

CGA₁ LPVNSPMNKG DTEVMKCIVE VISDTLSKPS PMPVSKECFE TLRGDERILS ILRHQNLLKE
LQDLALQGAK ERTTHQQKHS SYEDELSEVL EKPNDQAEPK EVTEEVSCKD AAE₁₁₃

Figure 28 : Séquence de la vasostatine II bovine

✓ *La Prochromacine et La Chromacine*

La prochromacine est un long fragment de CGA (CGA₇₉₋₄₃₁) ; retrouvé de façon majoritaire dans les granules de sécrétion des cellules chromaffines. Ce long peptides est actif contre des bactéries Gram⁺ et Gram⁻. Lorsqu'il est digéré par l'endoprotéase Lys-C, ce peptide peut être le précurseur d'un plus petit peptide la chromacine (Figure 29), plus actif contre les bactéries Gram⁺, mais ayant perdu son activité contre les bactéries Gram⁻. Ce petit peptide (CGA_{b173-186}) n'est actif que dans sa forme glycosylée et phosphorylée. (Strub et coll., 1996a).

CGA₁₇₃ YPGPQAKEDS EGPSQGPASR EK₁₈₆

Figure 29 : Séquence de la chromacine bovine

✓ *La chromostatine*

La chromostatine (Figure 30) n'est pas un peptide très bien conservé entre les espèces (Tableau IX). Ce peptide qui inhibe la contraction des vaisseaux sanguins induite par l'endothéline-1 (Aardal et coll., 1993), est présent au niveau de l'hypophyse, du pancréas et de la médullo-surrénale (Kimura et coll., 1995).

CGA₁₂₄ SDESDGDRP QASPLGPGP₁₄₃

Figure 30 : Séquence de la chromostatine bovine

✓ *La pancréastatine*

La pancréastatine (CGAb₂₄₀₋₂₈₈) (Figure 31) est le premier peptide caractérisé. Il est capable d'inhiber la libération d'insuline par les cellules β du pancréas stimulées par le glucose ainsi que la sécrétion de l'hormone parathyroïdienne (Tatemoto et coll., 1986 et Fasciotto et coll., 1989). Ces études *in vitro* ont été récemment confirmées par des études *in vivo* montrant que chez les diabétiques, la pancréastatine est élevée, et que le variant G₂₉₇S à le pouvoir d'inhiber la libération de glucose (O'Connor et coll., 2005). La pancréastatine, apparaît comme un agent endocrine responsable de l'activation de la glycogénolyse dans le foie et de la lipolyse des tissus adipeux. Elle agit en synergie avec le système sympatho-surrénalien. Ainsi, la pancréastatine serait considérée comme un peptide capable de maintenir le taux de glucose plasmatique.

CGA₂₄₈ **AAPGWPEDGA GKMGAEAAKP PEGKGEWAHS RQEEEMARA PQVLF**RG₂₉₆

Figure 31 : Séquence de la pancréastatine bovine

✓ *Le WE-14*

Le peptide WE-14 (Figure 32) est principalement produit dans les cellules chromaffines de la médullo-surrénale de rat (Curry et coll., 2002). Il est capable de potentialiser la libération d'histamine par les macrophages péritonéaux de rat (Forsythe et coll., 1997).

CGA₃₁₆ **WSKMDQLAKE**LTAE₃₂₉

Figure 32 : Séquence du WE-14 bovin

✓ *La catestatine*

En 1987, JP Simon décrit l'existence d'un peptide dérivé de la CGA capable d'inhiber la sécrétion des catécholamines (Simon et coll., 1989). Ce peptide n'a été caractérisé qu'en 1997 et nommé catestatine (CGAb₃₄₄₋₃₆₄) (Figure 33) (Mahata et coll., 1997). Le fragment catestatine de la chromogranine A est un inhibiteur endogène de la transmission cholinergique nicotinique, fonctionnant dans la commande négative de rétroaction de la sécrétion des catécholamines. Trois variants humains naturels de la catestatine ont été identifiés : Gly₃₆₄Ser,

Pro₃₇₀Leu, et Arg₃₇₄Gln. Ces variants ont été examinés pour leur capacité à empêcher quatre processus nicotiques. L'étude de ces variants met en avant l'existence de variations interindividuelles dans la signalisation nicotinique humaine (Mahata et coll., 2004). La catestatine est utilisée également comme marqueur de tumeurs ; en effet, elle est exprimée très fréquemment dans les tumeurs carcinoïdes de l'appendice (93,3%) (Prommegger et coll., 2004). Sur le plan structural, tandis que la catestatine naturelle est active, sa forme cyclique a perdu toute activité biologique, du fait de la déviation brutale de la conformation de son domaine amino-terminal (Preece et coll., 2004). Ce peptide a montré une activité antimicrobienne très forte et à spectre assez large puisqu'il s'est révélé actif contre différentes souches de bactéries à Gram⁺ (CMI₁₀₀ 2µM) et à Gram⁻ (CMI₁₀₀ 15µM) ainsi que contre différents champignons filamenteux (CMI₁₀₀ 1 à 80 µM) et levures (CMI₁₀₀ 6 à 30 µM) (Briolat et coll., 2005).

CGA₃₄₄ RSMRLSFRAR GYGFRG PGLQ L₃₆₄

Figure 33 : Séquence de la catestatine bovine

Une revue de la littérature concernant les peptides dérivés de la CGA (vasostatine-I, pancréastatine, catestatine) indique qu'ils sont impliqués dans la régulation autocrine par rétrocontrôle négatif de la sécrétion de différentes hormones dans des glandes sélectionnées. Les propriétés de ces trois peptides issus de la CGA impliquent l'existence d'un rôle pour la CGA en tant que prohormone multifactorielle intervenant dans des mécanismes homéostatiques importants tels que la régulation du calcium plasmatique, du glucose et des catécholamines. Basée sur les activités variées des vasostatines, de la pancréastatine et de la catestatine, l'hypothèse actuelle suggère que les peptides dérivés de la CGA seraient des régulateurs de l'homéostasie.

✓ *La parastatine*

La parastatine (Figure 34) est capable d'inhiber la sécrétion de CGA et de PTH dans la glande thyroïde, en réponse à une hypocalcémie (Fasciotto et coll., 1993). Cependant, la parastatine inhibe la sécrétion de PTH à des concentrations plus élevées que la pancréastatine ou les vasostatines.

CGA₃₄₈ LSF^RARGYGF RGPGLQLRRG WRPNSREDSV EAGLPLQVRG YPEEKKEEEG
 SANRRPEDQE LESLSAIEAE LEK₄₂₀

Figure 34 : Séquence de la parastatine bovine

✓ *Protéolyse de la chromogranine A par la PC2*

Les peptides dérivés, que nous venons de présenter, sont le fruit de la maturation protéolytique de la CGA. Cette maturation est réalisée par l'endopeptidase neuroendocrine PC2 (Doblinger et coll., 2003). La PC2 clive la CGA au niveau des sites dibasiques conservés (la PC1, dans le même système, n'exerce aucune activité protéolytique sur la CGA) (Arden et coll., 1994). L'immunomarquage de la pancréastatine dans les îlots pancréatiques humains et dans les tumeurs, est largement corrélé aux cellules α dans lesquelles la PC2 est particulièrement importante (Marcinkiewicz et coll., 1994). En accord avec ces résultats, il est possible de supposer que la PC2 dans les cellules α explique la conversion protéolytique de la CGA dans le pancréas et qu'elle joue un rôle essentiel dans le clivage de la CGA en divers peptides. Cependant, il n'est pas à exclure la contribution d'autres enzymes telles que la PC1 ou d'autres endopeptidases comme la plasmine qui sont capables également de générer des formes biologiquement actives de peptides issus de la CGA.

b- La CGB

La CGB apparaît comme une prohormone, précurseur de plusieurs peptides très bien conservés (Tableau X) aux activités biologiques variées. Ces peptides étant conservés, leurs activités doivent avoir une grande importance biologique, et pourraient être étendus aux autres espèces. En 1995, Strub et coll. ont cherché à caractériser les peptides naturels dérivés de la CGB bovine par une approche protéomique (microséquençage, électrophorèses bidimensionnelles) (Strub et coll., 1995).

Tableau X : Pourcentage d'homologie de séquence entre les différents peptides actifs de la CGB

	GAWK 396-464	BAM-1745 547-560	CCB 564-626	Sécrétoytine 614-626	CGB entière 1-626
Bœuf	100%	100%	100%	100%	100%
Homme	67%	93%	77%	77%	63%
Rat	41%	93%	79%	77%	52%
Souris	43%	93%	74%	77%	52%

✓ *Le GAWK*

Le peptide GAWK (Figure 35) est un marqueur de tumeurs neuroendocrines, car sa concentration augmente en cas de phéochromocytomes (Sekiya et coll., 1989) et de carcinomes de la thyroïde (Wirth et coll., 1994).

CGB₄₂₀ FLGEGHHRVQ ENQMDKARRH PQGAWKELDR NYLNYGEEGA
PGKWQQQGD L QDTKENREEA RFQDKQYSSH HTAE₄₉₃

Figure 35 : Séquence du GAWK humain

✓ *Le BAM -1745*

Le peptide BAM-1745 (Figure 36), purifié à partir des granules chromaffines bovines (Flanagan et coll., 1990), est localisé entre la paire KR et le triplet RKK de la région C-terminale de la CGB. Puisque la PC1 ou la PC2 co-localisent avec les chromogranines dans les granules chromaffines (Kirchmair et coll., 1992), elles seraient responsables de l'excision de ce peptide.

CGB₅₄₇ QYDRVAELDQ LLHY₅₆₀

Figure 36 : Séquence du BAM-1745 bovin

✓ *Le CCB (C-terminal Chromogranin B derived peptide)*

Le CCB (Figure 37) est le fragment C terminal de la CGB, décrit chez l'homme en 1987 (Benjannet et coll., 1987), et retrouvé chez le bœuf en 1997 (Strub et coll., 1995) ; sa fonction demeure inconnue. Cependant, son activité antibactérienne a été rapportée (Aunis et coll., 1998).

CGB₅₆₄ AEFPDFYDSE EQMSPQHTAE NEEKAGQGV LTEEEKELE NLAAMDLELQ
KIAEKFSGTR RG₆₂₆

Figure 37 : Séquence du CCB bovin

✓ *La Sécrétolytine*

La sécrétolytine (bCGB614-626) (Figure 38) a été isolée en 1995 par notre équipe, dans le milieu de sécrétion de cellules chromaffines stimulées (Strub et coll., 1996b). La séquence de la sécrétolytine est fortement homologue du domaine lytique N-terminal des cécropines d'insectes, et, comme suggéré par cette structure, ce peptide présente une forte activité antimicrobienne. De plus, les traits structuraux nécessaires à l'activité antibactérienne ont été caractérisés. Ainsi, son activité antibactérienne est directement reliée à la structure en hélice α (Strub et coll., 1996b). Des peptides homologues de la sécrétolytine ont été localisés chez la sangsue (Salzet et coll., 2002b), le porc (Wang et coll., 2001) et l'homme (Tasiemski et coll., 2002). Ce peptide est produit lors du transport axonal de la CGB dans le nerf splanchnique et libéré dans la rate dans divers états de stimulation. Une étude immunohistochimique montre que chez le porc, la sécrétolytine et le NPY colocalisent complètement dans les fibres nerveuses et les varicosités des vaisseaux sanguins, ainsi que le long des cellules du muscle lisse. Aucune activité antibactérienne n'a été détectée pour le fragment porcin de sécrétolytine. Le changement d'un résidu d'acide aminé (Thr/Asn) serait responsable de la perte d'activité antibactérienne (Depreitere et coll., 2004).

CGB ₆₁₄ QKIAEKFSGT RRG ₆₂₆
--

Figure 38 : Séquence de la sécrétolytine bovine

3- Localisation des chromogranines

Il y a une large distribution des cellules synthétisant la CGA dans l'organisme. Cependant les études récentes cherchent à caractériser sa présence dans différents tissus endocrines, afin de pouvoir la relier à différentes pathologies. En effet, il est très souvent rapporté une modification du taux de synthèse de la CGA dans les cellules tumorales.

Récemment, la CGA a été recherchée dans différents organes sécréteurs, comme les glandes salivaires, les testicules ou le tractus gastro-intestinal. Le gène et la protéine de la CGA sont exprimés dans la glande submandibulaire humaine. La présence de CGA dans la salive est décrite comme un marqueur de stress physiologique, toutefois, l'expression de la CGA est mal comprise chez l'humain. La CGA a été détectée dans les granules de sécrétion des cellules séreuses et ductales, comme par exemple au niveau des glandes salivaires

humaine et sécrétée dans la salive (Saruta et coll., 2005). La CGA a été retrouvée également dans les testicules bovins, ce qui laisse supposer que la CGA participerait en tant que facteur impliqué dans la régulation de la spermatogénèse (Payan-Carreira et coll., 2006). Une étude immunohistochimique des cellules immunoréactives à la CGA, dans le tractus gastro-intestinal de rat ayant subi une ovariectomie montre une densité anormale des chromogranines (normalement utilisé comme marqueurs cellulaire endocrine gastro-intestinal). Les résultats de cette étude montrent que les chromogranines contribueraient au développement des symptômes gastro-intestinaux de l'ostéoporose, tels que la diminution du taux de calcium et de certains lipides, fréquemment rencontrés chez des patients ayant une ostéoporose postménopausale (Ku et coll., 2005).

Ainsi, la modification du taux de CGA dans différents tissus serait impliquée dans différentes pathologies.

La localisation tissulaire de la CGB est identique à celle de la CGA. La CGB s'exprime dès le début de la vie embryonnaire : elle a été retrouvée dans le cerveau de fœtus. Le complexe du noyau solitaire est une station de relais viscérale primaire et un secteur intégratif du cerveau qui montre une forte densité en CGB (et également un de ses peptides dérivés : la sécrétolytine). Ces résultats démontrent que des peptides de chromogranine sont exprimés pendant la vie fœtale humaine dans des neurones du complexe du noyau solitaire, indiquant que ces peptides sont importants pendant le développement prénatal (Bitsche et coll., 2006). Cependant, le nombre de ces granules par cellule apparaît indépendant du taux de CGA et leur composition n'est pas constante; en particulier, il y aurait une variabilité considérable et jusqu'ici non expliquée dans le rapport entre la CGA et la CGB (Malosio et coll., 2004).

4- Implication des chromogranines dans les désordres neurodégénératifs

a- La CGA

De nombreuses études ont permis d'établir que les chromogranines sont détectables dans toute une variété de tumeurs endocrines, neuroendocrines et neuronales, à partir desquelles elles sont sécrétées dans la circulation sanguine (O'Connor et coll., 1984). La CGA est présente dans le fluide cérébrospinal et proviendrait du système nerveux central plutôt que d'une source périphérique. Alors que la CGA plasmatique répond aux altérations de l'activité

sympatho-surrénalienne périphérique, la CGA présente dans le fluide cérébrospinal n'est pas corrélée avec l'activité neuronale noradrénergique centrale (O'Connor et coll., 1993).

✓ *La maladie de Parkinson*

Chez les patients parkinsoniens, le taux de CGA dans le fluide cérébrospinal est diminué, ce qui constituerait un outil diagnostique. La CGA s'accumule dans les plaques séniles et pré-amyloïdes de la maladie d'Alzheimer, dans les corps de Lewy de la substance noire de la maladie de Parkinson et dans les neurones boursoufflés de la maladie de Pick (Munoz, 1991 et Yasuhara et coll., 1994).

✓ *La sclérose latérale amyotrophique*

La CGA interagit également avec des formes mutantes de la superoxyde-dismutase (SOD), qui sont liées à l'apparition de la sclérose latérale amyotrophique. Les chromogranines agiraient comme des chaperonnes afin, de favoriser la sécrétion des protéines SOD1 mutantes. (Urushitani et coll., 2006).

✓ *La schizophrénie*

Une étude, menée en *post-mortem*, a déterminé l'implication de la CGA au niveau du cortex préfrontal de patients atteints de schizophrénie. La CGA serait sensiblement diminuée dans les couches III-V du cortex préfrontal chez les sujets schizophrènes, comparés aux sujets témoins. Dans l'hippocampe, aucune différence significative entre les deux groupes n'a été observée. Ces résultats suggèrent un possible affaiblissement fonctionnel du contact synaptique préfrontal chez les patients atteints de schizophrénie (Iwazaki et coll., 2004).

✓ *La maladie d'Alzheimer*

Le lien entre la CGA et la maladie d'Alzheimer est étudié également. Ainsi, un déséquilibre de la disponibilité des chromogranines seraient responsable de l'altération de la neurotransmission et d'un fonctionnement réduit des vésicules à cœur dense. La CGA est susceptible d'être un médiateur entre les mécanismes neuronal, glial et inflammatoire propres à la maladie d'Alzheimer. Il est intéressant de noter que de nombreuses plaques, situées essentiellement dans les couches corticales profondes et contenant de la CGA, sont entourées d'une glie activée. (Lechner et coll., 2004). De plus, la CGA, avec d'autres composants de la plaque sénile, participerait à l'atténuation de la formation de celle-ci (Twig et coll., 2005).

✓ *Activation des cellules microgliales*

La CGA est une protéine surexprimée dans beaucoup de neuropathologies qui induit un phénotype activé des cellules microgliales provoquant ainsi l'apoptose neuronale. Des études montrent que la CGA active les cellules microgliales du cerveau, induisant une dégénérescence neuronale (Taupenot et coll., 1996 ; Ciesielski-Treska et coll., 1998 et Ciesielski-Treska et coll., 2001). Les voies de signalisation mobilisées dans ces neurones impliquent un récepteur kinase de la mort cellulaire, et le cytochrome C mitochondrial. De ce fait, la CGA représente un facteur inflammatoire endogène efficace responsable de la dégénération neuronale (Ciesielski-Treska et coll., 2001 et Ulrich et coll., 2002).

b- La CGB

✓ *La schizophrénie*

Le taux de CGB dans le fluide cérebrospinal est réduit chez les patients schizophrènes (Landén et coll., 1999). Les études de génétique sur la schizophrénie au Japon impliquent une région génomique proche du locus du gène de la CGB sur le chromosome 20 (Kitao et coll., 2000) ; des études d'association allélique en Chine ont associé des polymorphismes nucléotidiques simples au *locus* du gène de la CGB avec la schizophrénie (Zhang et coll., 2002).

✓ *La maladie de Creutzfeld-Jakob*

Les lésions du cerveau dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob (CJD) incluent la perte neuronale, l'astrogliose et l'activation de la microglie. La microglie jouerait un rôle principal dans le neurodégénération induite par le prion (Brown et coll., 1996). Cependant, les molécules intermédiaires assurant l'interaction entre les neurones et les cellules microgliales demeurent inconnues. Les chromogranines activent les cellules microgliales en provoquant un effet neurotoxique. L'expression de l'ARNm de la CGB a été retrouvée modifiée dans des lignées de neuroblastomes de souris infectés par la scrapie (Doh-ura et coll., 1995). L'immunoréactivité comparée de la CGA et de la CGB a été réalisée sur des tissus de patients atteints de CJD ou de la maladie d'Alzheimer. Une immunoréactivité positive a été détectée pour la CGB (mais pas pour la CGA) sélectivement associée aux agrégats de la protéine prion. Ceci suggère une influence spécifique de la protéine amyloïde constitutive sur la sécrétion de CGA et un rôle de CGB dans le processus neurodégénératif de CJD. La présence de CGB dans les dépôts liés à l'accumulation de PrP, dans la maladie de Creutzfeld-Jacob

(CJD) suggère que la CGB serait responsable d'un lien entre les neurones affectés et les cellules microgliales (Rangon et coll., 2003).

5- Utilisation des chromogranines comme marqueur de tumeurs neuroendocrines

a- La CGA

Depuis quelques années, le dosage sérique de la CGA est utilisé comme marqueur de tumeurs neuroendocrines. Un test radioimmunologique a été mis au point pour détecter la CGA circulante (O'Connor et coll., 1984 et O'Connor et coll., 1989). En général, la quantification de la molécule de CGA intacte dans le plasma présente une meilleure sensibilité pour le diagnostic des tumeurs neuroendocrines que la quantification des fragments (Stridsberg et coll., 1995).

La CGA a été décrite comme marqueur potentiel pour des tumeurs neuroendocrines. En raison d'une protéolyse étendue qui mène à une grande hétérogénéité des fragments circulants, un kit de *radioimmunoessai* a été mis au point (par la société Cis-Bio et plusieurs chercheurs de notre équipe) grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiquement dirigés contre des régions moins maturées de la CGA : la région 145-245 (Degorce et coll., 1999).

La CGA a été utilisée comme contrôle dans la mise en place d'une nouvelle technique de puces peptidiques utilisées pour la caractérisation des régions antigéniques de la CGA humaine. La CGA a été choisie en tant que marqueur sérique de tumeurs neuroendocrines, mais aussi en tant que précurseur de plusieurs peptides à activités biologiques (Chiari et coll., 2005).

En ce qui concerne le gain de sensibilité, une nouvelle méthode de détection des transcrits de CGA, basée sur la PCR quantitative en temps réel, a été mise au point afin d'identifier des tumeurs neuroendocrines. La surexpression de l'ARNm et de la protéine de la CGA dans les tumeurs carcinoïdes permet d'identifier les cellules métastatiques. Ainsi, la PCR de la CGA est utilisée pour identifier les micrométastases, difficiles à localiser par microscopie, aussi bien que les tumeurs dont la morphologie n'est pas reconnues. L'utilisation de cette stratégie sensible servirait à des fins diagnostiques et thérapeutiques (Kidd et coll., 2006).

b- La CGB

La CGB a été détectée dans de nombreuses tumeurs neuroendocrines, et les taux circulants de cette protéine reflètent l'activité de sécrétion de ces tumeurs. Les cellules tumorales produisant de la prolactine dans l'hypophyse antérieure ne présentent pas de CGA mais sont positives pour la CGB (et la sécrétogranine II). De plus, les taux plasmatiques de GAWK et CCB, peptides dérivés de la CGB, sont élevés chez les patients présentant des tumeurs pancréatiques (Sekiya et coll., 1989 et Yasuda et coll., 1993) et ceux ayant des tumeurs bronchiques (Vieau et coll., 1991).

Des anticorps dirigés contre les épitopes C-terminaux de CGB peuvent être indiqués pour le diagnostic des phéochromocytomes (Portela-Gomes et coll., 2004).

6- Fonction biologique des chromogranines

a- La CGA

✓ Interaction CGA-SgIII

La fonction intragranulaire et extracellulaire de la CGA est encore recherchée. Au niveau intragranulaire, la CGA interagirait avec des protéines intragranulaires et en particulier avec un autre membre de la famille des sécrétogranines : la sécrétogranine III (SgIII). La SgIII se lie au cholestérol, et en se liant aussi à la CGA, guiderait celle-ci vers les granules (Hosaka et coll., 2004). Celle-ci se lie à la carboxypeptidase E (CPE) qui facilite l'entrée des prohormones dans les granules de sécrétion. SgIII et CPE forment ainsi un complexe de triage fonctionnel en s'accrochant aux membranes des granules, riches en cholestérol (Hosaka et coll., 2005).

✓ Interaction de la CGA sur le récepteur de l'IP3

Les granules de sécrétion des cellules chromaffines contiennent de fortes concentrations de calcium (>40 mM). La fixation de l'IP3 sur son récepteur au niveau de la membrane des granules, entraîne la libération de calcium intragranulaire dans le cytoplasme (Yoo et coll., 1990). En 1995, une étude a montré que la forme tétramérique de la CGA interagissait avec quatre boucles intraluminales de récepteurs à l'IP3 (Yoo et coll., 1995). Des travaux récents indiquent que la fixation de CGA sur le récepteur de l'IP3 provoque des changements structuraux qui facilitent la liaison de l'IP3 à son récepteur et la libération de calcium dans le cytoplasme (Yoo et coll., 2000a et Yoo et coll., 2000b). Ainsi, la CGA serait impliquée dans les mécanismes qui contrôlent la concentration cytoplasmique de calcium en

facilitant l'activation des canaux calciques des récepteurs de l'IP3 présents sur les membranes des granules.

✓ Rôle dans les mécanismes de sécrétion

La CGA est impliquée dans la formation des granules de sécrétion matures, qui participent à la voie de sécrétion régulée (Figure 39). Le taux cellulaire de CGA, comparé entre des cellules mélanotropes sécrétrices ou de stockage, n'est pas fonction de l'activité sécrétrice des cellules, mais est corrélé au taux de stockage dans les granules des cellules (Peinado et coll., 2006).

Une expérience de microscopie électronique a pu mettre en évidence la présence, non seulement de la synaptotagmine I, mais également de la syntaxine A1 (les éléments principaux de la formation du complexe de fusion entre le granule de sécrétion et la membrane plasmique lors de l'exocytose) dans les granules de sécrétion des cellules chromaffines bovines. De plus, ces protéines interagissent avec les CGA et CGB. L'interaction entre les chromogranines et les composants du complexe de fusion suggère également la participation active de la CGA et de la CGB dans la formation de ce complexe suivie de l'exocytose (Yoo et coll., 2005b).

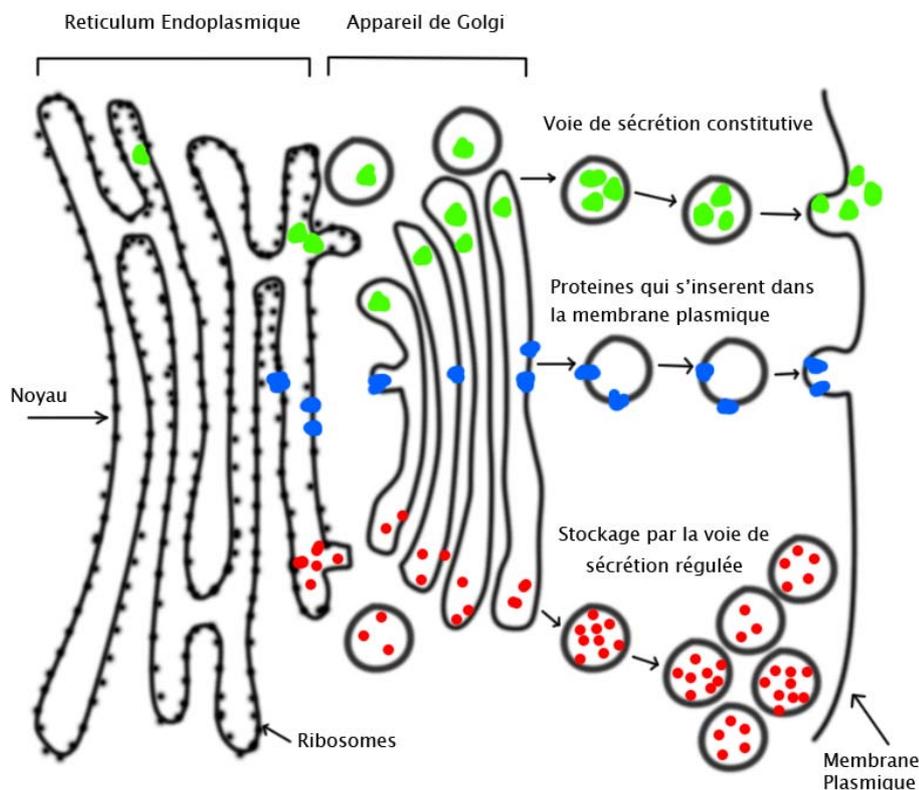


Figure 39 : Schéma des voies de sécrétion régulières et constitutives

✓ Rôle de la CGA dans la circulation

De plus, il y a un lien entre d'une part la biogénèse des granules de sécrétion, médiée par la CGA et nécessaire pour le stockage des catécholamines, et d'autre part l'inhibition, médiée par la catestatine, de la libération des catécholamines lors d'une stimulation cholinergique. Celle-ci régule le contrôle automatique de la pression sanguine, d'où découle l'hypertension (Kim et coll., 2005a). Une fois dans la circulation sanguine, la CGA protège les vaisseaux sanguins contre les nécroses tumorales induites par la libération du TNF- α . Ainsi, la CGA circulante participerait au maintien de la barrière endothéliale et à la protection des vaisseaux contre la fuite du plasma provoquée en conditions pathologiques (cancer ou arrêt cardiaque) par une grande production de TNF- α (Ferrero et coll., 2004).

Afin de mieux comprendre le rôle intragranulaire et extracellulaire de la CGA, des souris KO CGA ont été mises au point. Il existe deux souches de souris KO. Chaque souche se remarque par des dysfonctions physiologiques différentes. La première souche de souris CGA^{-/-} présente :

- une diminution de la taille et du nombre des granules chromaffines,
- une élévation de la pression sanguine, ainsi qu'une disparition de la variation diurne de la pression sanguine,
- une augmentation de la masse et de la taille de la cavité du ventricule gauche,
- une diminution du taux de catécholamines, de NPY et de l'ATP,
- une augmentation du ratio catécholamines/ATP dans les granules chromaffines,
- une augmentation du taux plasmatique de catécholamines et de NPY.

Ainsi, la perte de la fonction physiologique de la catestatine chez les souris CGA^{-/-}, couplée avec la dérégulation du stockage des neurotransmetteurs et de leur libération, agissent de concert pour altérer le contrôle autonome de la circulation *in vivo*, en provoquant de l'hypertension (Mahapatra et coll., 2005).

L'ablation spécifique du gène de la CGA, chez le second modèle de souris, provoque dans les granules de sécrétion des cellules neuroendocrines une plus grande expression des autres sécrétogranines. Chez ces souris mutantes pour le gène de la CGA, les niveaux d'ARNm et de protéines dans la médullo-surrénale des autres sécrétogranines (chromogranine B, sécrétogranines II à VI) se sont retrouvés augmentés de 2 à 3 fois. Par conséquent, cette surexpression des autres sécrétogranines est susceptible de compenser l'insuffisance en CGA (Hendy et coll., 2006). Les souris transgéniques déficientes en CGA ont une biogénèse des granules de sécrétion aberrante. Le prolongement des bourgeonnements

des granules à cœur dense a été inversement corrélé avec le nombre de granules formés. Ces données indiquent un rôle essentiel de la CGA dans la biogénèse des granules chromaffines et la régulation du stockage des catécholamines *in vivo* (Kim et coll., 2005b).

b- La CGB

✓ Implication dans les phénomènes de sécrétion

La première preuve de l'existence d'un signal de sortie dans la séquence de la CGB a été fournie par le traitement des phéochromocytomes (PC12) par le dithiothreitol (DTT) qui produit le clivage réductif des ponts disulfures. Sous ces conditions, la CGB a été identifiée dans la voie de sécrétion constitutive (Chanat et coll., 1993), alors que ses propriétés agrégatives n'ont pas été affectées (Chanat et coll., 1994). Ainsi, le pont disulfure est essentiel à la sortie de la CGB. De plus, les protéines de la voie régulée n'ayant pas de signal de sortie, mais étant compétentes pour l'agrégation, sortent néanmoins *via* une liaison avec une protéine porteuse d'un signal de sortie. Une preuve directe de la propriété de coagrégation a été apportée par une expérience de coexpression virale de la CGB délétée et de CGB intacte. Toutes deux ont été exportées correctement vers les granules de sécrétion (Huttner et coll., 1995 et Natori et coll., 1996). Ainsi, deux classes de protéines coexistent et participent à la voie de sécrétion : l'une comporte des protéines ayant à la fois un signal de sortie et des propriétés d'agrégation et l'autre classe correspond à des protéines n'ayant pas de signal de sortie, mais étant compétentes pour l'agrégation. Ainsi, la CGB aurait un rôle dans l'adressage des protéines vers les granules de sécrétion (Huttner et coll., 1995 et Natori et coll., 1996).

✓ Rôle potentiel dans la transcription

En 2002, SH Yoo et son équipe (Yoo et coll., 2002a) ont observé, par microscopie à fluorescence, la présence de CGB non seulement dans le cytoplasme mais également dans le noyau de plusieurs types cellulaires. Dans les cellules PC12, des analyses d'immunodétection ont démontré la présence de CGB à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau tandis que la CGA n'a pas été détectée dans le noyau. SH Yoo et son équipe ont recherché également la présence d'une séquence de localisation nucléaire (NLS ; Nuclear Localisation Sequence) dans la CGB. Ils ont découvert une séquence NLS putative, Pro-Glu-Val-Asp-Lys-Arg-Arg (PEVDKRR) (résidus 235-241), qui est absente de la CGA. Une mutation dans cette séquence diminue le taux de CGB dans le noyau, mais ne parvient pas à empêcher complètement le transport de la CGB vers le noyau. Ceci suggère qu'en plus de la séquence NLS, d'autres régions de la CGB ou des facteurs inconnus interviennent. Selon d'autres études, la CGB

interagit étroitement avec une des protéines transmembranaires des granules de sécrétion, le récepteur de l'inositol 3 P (IP3R) (Yoo, 1994 et Yoo et coll., 2000a). Or, le fait que cette protéine soit également présente dans le noyau suggère que la CGB migrerait vers le noyau grâce à cette interaction (Malviya et coll., 1990 ; Gerasimenko et coll., 1995 et Humbert et coll., 1996).

La propriété de co-translocation de la CGB n'est certainement pas partagée avec la CGA du fait de son manque d'interaction avec l'IP3R au pH physiologique de 7,5 (Yoo et coll., 2000a). Par ailleurs, l'affinité de la CGB pour le calcium ne serait pas le seul facteur expliquant sa localisation nucléaire. En effet, cette propriété est partagée par les autres chromogranines. La présence de CGB dans le noyau souligne la nature spécifique de la translocation nucléaire de la CGB et présage de nouveaux rôles pour la CGB dans le noyau.

Des analyses des taux d'ARNm exprimés grâce à un système de *microarray* portant sur l'ADNc de 2400 gènes humains ont mis en évidence que la transfection de la CGB affecte la transcription de plus de 40 gènes soit par une induction soit par une suppression (Yoo et coll., 2002b). Ces résultats établissent un rôle de la CGB dans le contrôle de la transcription de plusieurs gènes, incluant ceux des facteurs de transcription par induction ou suppression. L'inositol 3 P (IP3) a été présenté comme jouant un rôle important dans des fonctions nucléaires, cependant le mécanisme d'action calcium dépendant de l'IP3 dans le nucléoplasme n'a pas été mis en évidence.

Récemment, la présence de CGB et de trois isoformes du récepteur de l'IP3 (IP3R) ont été mis en évidence dans le nucléoplasme, et colocalisent largement avec les régions d'hétérochromatine et d'euchromatine. En raison du rôle essentiel du couplage de la CGB avec l'IP3R dans le dégagement d'IP3 dépendant du calcium, le couplage potentiel entre la CGB et les IP(3)Rs dans le nucléoplasme a été étudié. La présence d'un complexe nucléoplasmique, qui se compose d'IP3R, de CGB, et de phospholipides, avec une masse moléculaire très élevée (10^7 Da) a été découverte, suggérant la possibilité de la présence d'un stockage d'IP3 dans le nucléoplasme (Yoo et coll., 2005a). Etant donné la présence de CGB dans le noyau, ces résultats mettent l'accent sur le rôle de la CGB nucléaire dans la translocation d'IP3 induite par le calcium (Huh et coll., 2006).

VI- La sécrétogranine II

La sécrétogranine II est le membre de la famille des chromogranines/sécrétogranines le moins abondant dans les granules de sécrétion des cellules chromaffines (2 % de la matrice intra-granulaire chez le bœuf). Cependant, elle est très étudiée au niveau du système nerveux central, et bien conservée chez les eucaryotes supérieurs (Figure 40).

1 – Synthèse et expression de la SgII

La SgII est exprimée à tous les niveaux de l'axe reproducteur du poisson rouge, y compris au niveau de l'hypothalamus, de l'hypophyse et des ovaires. Une étude récente a montré que les niveaux d'expression de la SgII changent de façon saisonnière ; ils sont plus élevés en hiver et plus bas au printemps (période de reproduction pendant laquelle le taux de testostérone augmente). Bien que seule la testostérone ne modifie pas le taux d'expression de ces différents gènes, elle supprime les effets stimuloires de la *Gonadotropine Releasing Hormone* (GnRH) sur l'expression de la LHβ et de la SgII. C'est la première fois que la testostérone apparaît comme modulateur de l'expression de SgII dans l'hypophyse (Samia et coll., 2004).

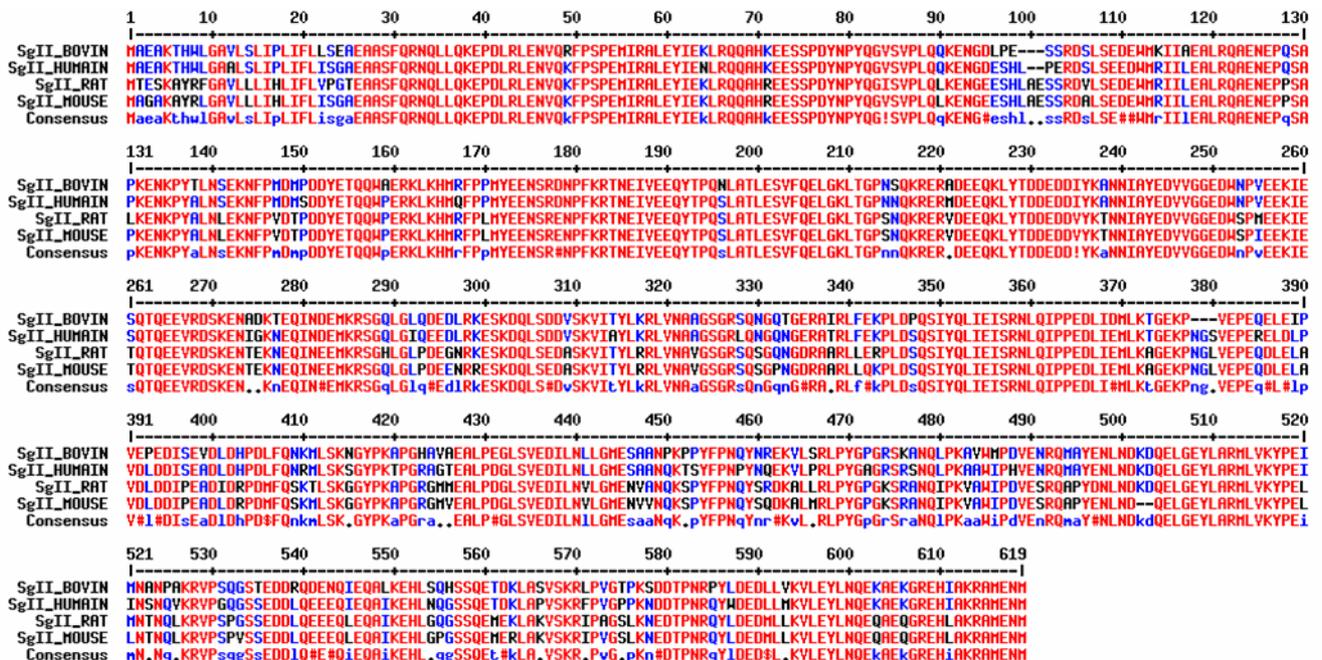


Figure 40 : Alignement des séquences de SgII de bœuf, homme, rat et souris
 La SgII apparaît hautement conservées (en rouge : les acides aminés identiques, en bleu, les acides aminés de même nature)

La SgII et la CGA sont régulées de façon différentielle dans des sous-populations de cellules mélanotropes présentes dans le lobe intermédiaire de l'hypophyse. Ainsi, l'expression de SgII est fortement liée à l'activité sécrétrice des cellules mélanotropes, tandis que l'expression de la CGA est liée au stockage d'hormones dans ce type de cellules endocrines (Peinado et coll., 2006).

Chez le poisson rouge, deux formes partiellement maturées de la SN ont été détectées SgII₁₉₃₋₄₅₉ dans l'hypophyse et SgII₁₉₃₋₃₅₉ dans l'hypothalamus (Zhao et coll., 2006). Aucune immunodétection n'a été observée dans le rein, l'ovaire, le cervelet, et le télencéphale, tandis que l'ARNm de la SgII est exprimé dans tous ces tissus, ce qui peut s'expliquer par l'absence de traduction de l'ARNm, une dégradation rapide de l'ARNm, ou bien une maturation totale et rapide de la SgII générant des peptides non détectés. L'abondance d'un fragment de 57 kDa indique que ce produit de la SgII (contenant la séquence de la SN) est une des formes de stockage majoritaire dans les granules de sécrétion de l'hypophyse du poisson rouge. L'expression élevée de SgII et sa maturation en SN dans l'hypothalamus et l'hypophyse suggèrent des rôles importants pour les peptides dérivés de la SgII présents dans des tissus neuroendocrines (Zhao et coll., 2006).

Les changements dans le taux d'ARNm de la SgII, qui est régulé par la dépolarisation cellulaire, représente un marqueur utile pour évaluer les changements rapides et durables (positifs et négatifs) de l'activité neuronale.

2- Structure primaire et maturation protéolytique

La sécrétogranine II est une protéine sulfatée qui a été décrite pour la première fois dans l'hypophyse antérieure de bœuf et de rat (Rosa et coll., 1981 et Zanini et coll., 1981). C'est une protéine acide (pHi 5), hydrophile et porteuse de modifications post-traductionnelles. En effet, elle a été découverte lors d'une étude sur électrophorèse bidimensionnelle de protéines extraites d'hypophyses de bœuf et de rat marquées au ³⁵S et au ³²P (Rosa et coll., 1985). La SgII est porteuse de phosphorylations, cependant celles-ci n'ont pas encore été localisées (Rosa et coll., 1985). La SgII a une masse théorique de 68 kDa et une masse apparente estimée à 86 kDa par électrophorèse SDS-PAGE (Rosa et coll., 1981). C'est une protéine riche en résidus d'acide glutamique et aspartique (respectivement 13 % et 7 %) répartis tout le long de sa séquence. La localisation et la fonction des modifications post-traductionnelles portées par la SgII ne sont pas encore déterminées. Comme les autres chromogranines, la SgII apparaît comme une prohormone qui génère différents peptides grâce

à l'action de prohormones convertases (Laslop et coll., 1998). Une étude a été menée sur la maturation de la SgII après coïnfection des cellules GH4C1. Elle a révélé que la PC1 est l'enzyme la plus efficace dans le clivage de la molécule SgII (Hoflehner et coll., 1995). Dans cette étude, la PC1 s'est montrée comme étant la seule enzyme capable de générer la sécrétoneurine (SN) qui est encadrée par des sites dibasiques. De plus, la maturation protéolytique de la SgII par la PC2 génère principalement des fragments peptidiques de maturation incomplète et la SN n'a pu être mesurée en quantité significative. Toutes les autres prohormones convertases testées, c'est-à-dire, la furine, la PACE4 et la PC5 n'ont pas montré d'activité protéolytique sur la SgII.

En 1995, Dittié et coll., (Dittié et coll., 1995) ont rapporté la maturation protéolytique de la SgII dans un clone de cellule PC12 transfectée avec la PC2. En utilisant une variété de sept anticorps dirigés contre différentes régions spécifiques de la SgII, plusieurs fragments issus de la maturation ont été caractérisés. Ces fragments correspondent aux peptides endogènes présents dans les tissus neuroendocrines (Kirchmair et coll., 1993) et correspondent également à ceux observés dans les expériences de coïnfection mentionnées ci-dessus (Hoflehner et coll., 1995). En comparaison avec les résultats obtenus après transfection, la maturation de la SgII dans les cellules PC12 transfectées avec la PC2 est plus importante (Figure 41). Cependant, la formation de SN n'a pas été examinée.

En plus d'être un marqueur physiologique des adénomes de l'hypophyse, la SgII apparaît comme un outil pertinent pour l'étude des mécanismes de maturation protéolytiques liés à différentes tumeurs neuroendocrines (Vallet et coll., 1997). La région C-terminale de la SgII pourrait être utilisée comme marqueur permettant de faciliter le diagnostic de phéochromocytomes (Portela-Gomes et coll., 2004).

Des études cinétiques, par *pulse-chase*, ont montré, dans les cellules lactotropes (productrices de prolactine), que le clivage protéolytique de la SgII s'effectuait de la région C-terminale vers la région N-terminale. La SgII mature et ses peptides sont sécrétés par les cellules de l'hypophyse antérieure lors d'une stimulation par la TSH, un sécrétagogue de la prolactine (Muller et coll., 1995). Il est possible de corréler ces résultats avec le fait que, dans les sécrétions de cellules chromaffines en culture, le peptide le plus abondant issu de la SgII est le peptide N-terminal AMENM (Soszynski et coll., 1993) (Figure 42).

A pH 5,2, la SgII lie le calcium et forme des agrégats en présence de 10 mM de calcium (Gerdes et coll., 1989). Le calcium est essentiel pour la maturation des prohormones contenues dans les granules de sécrétion ; il est également important dans l'adressage de la SgII vers les granules de sécrétion en formation (Carnell et coll., 1994). La stimulation des

cellules LβT2 par la GnRH provoque une colibération de LH et de SgII. Cette libération se ferait par la voie régulée (qui dépend des chromogranines), et suggère la stimulation de la sécrétion de LH par l'activine grâce à la voie constitutive (qui ne dépend pas des chromogranines) (Nicol et coll., 2004). La régulation de la synthèse de la SgII a été étudiée sur des cellules chromaffines en culture. Il s'est avéré que la stimulation de la synthèse de la SgII nécessite le recrutement de l'AMPC et de la protéine kinase C (Soszynski et coll., 1993). De plus, le taux d'ARNm de SgII est augmenté dans les cellules chromaffines lors de l'induction par les cytokines, TNF-α et l'IL-1 (Ait-Ali et coll., 2004). Cette réponse stimulée dépend du temps et de la dose d'application des cytokines.

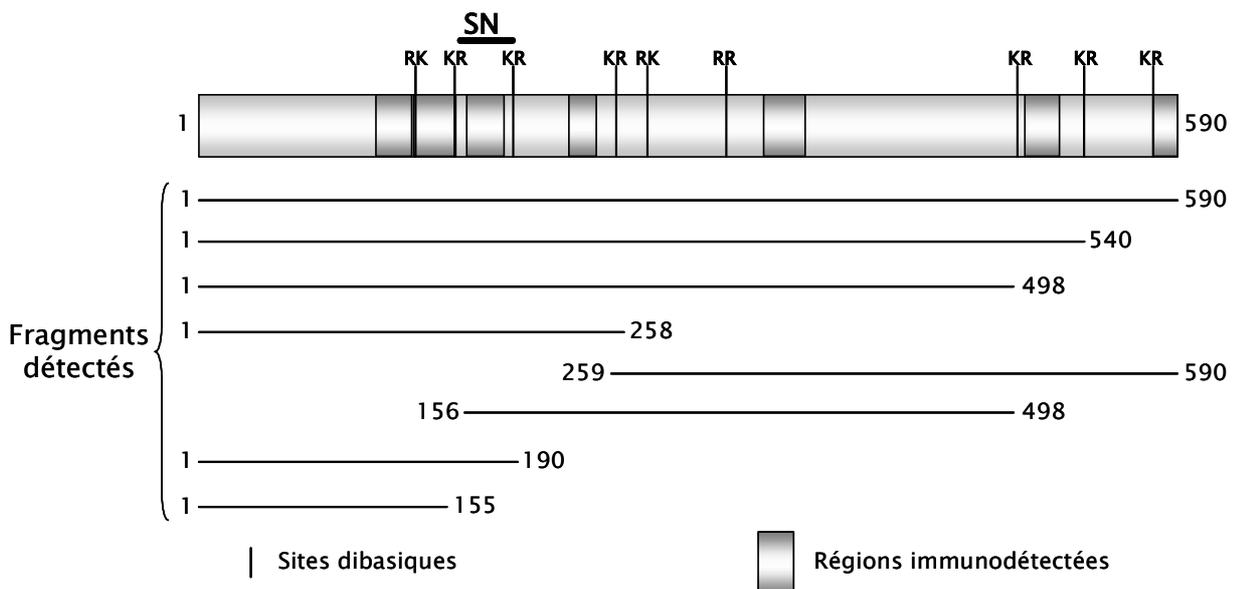
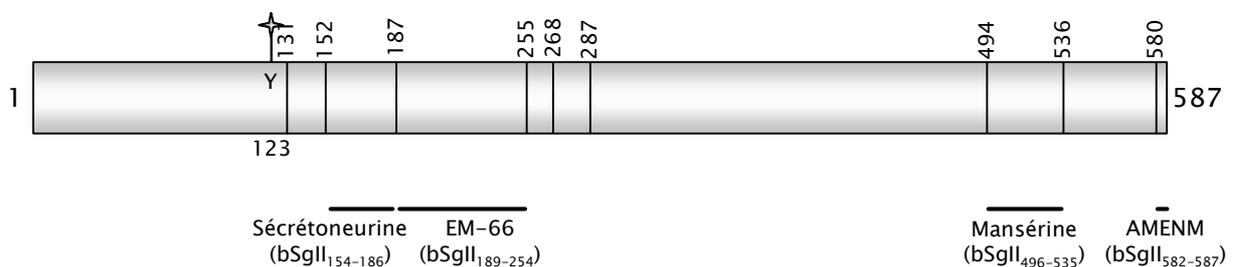


Figure 41 : Caractérisation des peptides issus de la maturation protéolytique de la SgII par les prohormones convertases (Dittié et coll., 1995)



✦ Sulfatation

Figure 42 : Localisation sur la séquence de la SgII des modifications post-traductionnelles et des peptides dérivés (par homologie de séquence) (Rosa et coll., 1985 et Dittié et coll., 1995)

3- Les peptides issus de la maturation de la SgII

La littérature ne décrit l'existence que de quatre peptides, très bien conservés (Tableau XI), naturellement issus de la maturation protéolytique de la SgII.

Tableau XI : Pourcentage d'homologie entre la séquence des différents peptides de SgII par rapport à la séquence de bœuf

	Sécrétoeurine 154-186	EM-66 189-254	Mansérine 496-533	AMENM 582-587	SgII entière 1-587
Bœuf	100%	100%	100%	100%	100%
Homme	97%	92%	78%	100%	87%
Rat	91%	80%	70%	100%	80%
Souris	91%	80%	63%	100%	79%

a- La sécrétoeurine

La sécrétoeurine (SN) (Figure 43) est le premier peptide découvert issu de la maturation de la SgII. Ce peptide de 33 acides-aminés, très bien conservé chez les eucaryotes supérieurs, a été découvert chez la grenouille rieuse (Vaudry et coll., 1991)(Kirchmair et coll., 1993). La SN est le seul peptide dérivé de la SgII pour lequel des activités biologiques ont été rapportées. En plus de stimuler la libération de dopamine dans le cerveau (Saria et coll., 1993), un neurotransmetteur inhibiteur important dans le contrôle moteur, la SN est impliquée dans la régulation neuroimmune en modulant la chimiotaxie et la prolifération d'une large variété de cellules impliquées dans la réparation tissulaire (Kähler et coll., 1996 ; Gruber et coll., 1997 ; Kähler et coll., 1997 et Dunzendorfer et coll., 1998). La SN stimule la néovascularisation postnatale par la mobilisation, la migration et l'incorporation des cellules progénitrices endothéliales (Kirchmair et coll., 2004a). Ainsi, la SN apparaît comme une nouvelle cytokine angiogénique qui coordonne les relations entre les systèmes nerveux et vasculaire (Kirchmair et coll., 2004b). La SN, induit un phénomène chimiotactique (Reinisch et coll., 1993) et la libération de dopamine par les cellules du striatum de rat (Saria et coll., 1993 et Agneter et coll., 1995). La SN plasmatique augmenterait chez les patients atteints de tumeurs neuroendocrines gastroentéropancréatiques ou de phéochromocytomes (Ischia et coll., 2000). En effet, en 1996, une étude avait montré que la SN dans le sérum était principalement dérivée de l'intestin (duodénum et colon) (Leitner et coll., 1996).

La SN est spécifiquement exprimée dans le tissu endocrine, neuroendocrines et nerveux. Dans le cerveau, la SN est exprimée dans de nombreuses zones. Dans les conditions

physiopathologiques, particulièrement suite à l'hypoxie cellulaire, l'expression de SN est induite dans les tissus non endocrine tels que le tissu musculaire, les pneumocytes ou les tumeurs épithéliales. Plusieurs effets biologiques ont été attribués à la SN. La SN libère la dopamine dans les coupes de striatum de rat de façon dose-dépendante et influence la croissance des neurites lors du développement du cervelet. Elle a une action attractive spécifique et potentialise les monocytes, les éosinophiles et les cellules endothéliales, sous l'action d'un gradient de concentration, agissant ainsi comme une cytokine angiogénique comparable au VEGF (Fischer-Colbrie et coll., 2005). Ainsi, la SN participe aux mécanismes de l'inflammation et jouerait un rôle dans l'induction de la néovascularisation dans les maladies ischémiques telles que les maladies de l'artère coronaire périphérique (ou rétinopathie diabétique), l'ischémie cérébrale ou dans les tumeurs. Les voies de signalisation des divers effets biologiques n'ont pas été identifiées en détail, mais la plupart des données mettent l'accent sur des récepteurs couplés aux protéines G dont l'activation est associée à divers événements intracellulaires (Fischer-Colbrie et coll., 2005).

La SN a été détectée dans la rétine en 1995 (Overdick et coll., 1996) et dans les cellules du segment antérieur de l'œil pour la première fois en 2003 (Kralinger et coll., 2003). Indépendamment de l'innervation sympathique, il est évident que la SN est un constituant des neurones sensoriels sensibles à la capsaïcine dans le ganglion trigeminale de rat et les fibres C amyéliniques dans l'iris de rat, ce qui indique une implication de ce peptide dans la réponse oculaire irritative (un modèle de l'inflammation neurogène). En raison de l'association des nerfs avec des vaisseaux sanguins et de ses propriétés angiogéniques, la SN peut être impliquée dans des processus de néovascularisation (Troger et coll., 2005).

SgII ₁₅₄ TNEIVEEQYT PQNLATLESV FQELGKLTGP NSQ ₁₈₆
--

Figure 43 : Séquence de la SN bovine

b- Le peptide EM-66

La découverte du peptide EM-66 (Figure 44) est plus récente (Anouar et coll., 1998). Ce peptide issu de la maturation protéolytique de la SgII est détecté spécifiquement (chez le rat), dans l'hypophyse et la glande surrénale, où il est stocké dans les granules de sécrétions (Montero-Hadjadje et coll., 2003). La concentration en peptide EM-66 varie en fonction de la

nature bénigne ou maligne des phéochromocytomes. En effet, une étude a été menée afin de caractériser le peptide EM-66 dans le plasma et l'urine de patients sains et de patients atteints de phéochromocytomes afin de vérifier l'utilité de ce peptide en tant que marqueur. Ainsi, le peptide EM-66 est un marqueur plasmatique sensible, considéré comme un outil complémentaire dans la détection des phéochromocytomes (Guillemot et coll., 2006). Le peptide EM-66 apparaît impliqué dans le contrôle du comportement alimentaire et/ou la réponse au stress associé au jeûne. Ces données indiquent la plasticité physiologique du système EM-66 dans l'hypothalamus et mettent en jeu ce nouveau peptide dans la régulation des fonctions neuroendocrines (Boutahricht et coll., 2005).

SgII₁₈₉ ERADEEQKLY TDEDDIYKA NNIAYEDVVG GEDWNPVEEK IESQTQEEVR
DSKENADKTE QINDEM₂₅₄

Figure 44 : Séquence du peptide EM-66 bovin

c- La mansérine

En 2004, un nouveau neuropeptide de 40 acides-aminés a été isolé chez le rat : la mansérine (Figure 45). La mansérine est détectée dans les cellules neuronales de plusieurs noyaux hypothalamiques et dans les neurones de l'éminence médiane. Ces résultats suggèrent que la mansérine exerce un rôle spécifique dans le système neuroendocrine (Yajima et coll., 2004). Cependant, aucune fonction biologique ne lui est encore attribuée.

SgII₄₉₆ VPSQGSTEDD RQDENQIEQA LKEHLSQHSS QETDKLASVS₅₃₅

Figure 45 : Séquence de la mansérine bovine

d- Le peptide AMENM

Le peptide AMENM (Figure 46), découvert en 1993, est un peptide très court, produit de la maturation protéolytique de la région C-terminale de la SgII. Ce peptide, dont aucune fonction biologique n'a encore été déterminée constitue le fragment majoritaire issu de la SgII dans les sécrétions de cellules chromaffines bovines en culture (Soszynski et coll., 1993).



SgII₅₈₂ AMENM₅₈₇

Figure 46 : Séquence du peptide AMENM bovin

VII- Conclusion

Les chromogranines sont des prohormones précurseurs de nombreux peptides aux activités biologiques diverses. Cependant, toutes les fonctions biologiques des chromogranines ne sont pas encore connues. De même l'ensemble de leurs modifications post-traductionnelles n'ont pas encore été appréhendées.

Mes résultats présentent la caractérisation des modifications post-traductionnelles de la CGB bovine, ainsi que celles de la SgII (granine minoritaire des granules de sécrétions des cellules chromaffines). Je vais également mettre en avant le fait que la SgII, de même que la CGA et la CGB, peut être un précurseur de peptides à activité antimicrobienne, et donc participer à la relation existante entre les systèmes neuro-endocrines et immunitaires. Enfin, je vais présenter une application thérapeutique possible d'un peptide antimicrobien dérivé de la CGA.

Résultats expérimentaux

Chapitre I : Analyse des modifications post-traductionnelles de la Chromogranine B présente dans les granules de sécrétion des cellules chromaffines bovines

I- Contexte de l'étude

La chromogranine B est la granine majoritaire des granules chromaffines humains. Son caractère ubiquitaire, le grand nombre de clivage protéolytique qu'elle subit ainsi que la grande variété des modifications post-traductionnelles qu'elle porte en font un modèle d'étude privilégié pour une analyse structure-fonction. Dans ce contexte, dans une première approche, j'ai caractérisé et localisé les modifications post-traductionnelles de la CGB bovine avant d'élargir ce travail à la CGB humaine. Notre laboratoire ayant réalisé la même étude sur la CGA, nous disposons des outils, de la méthodologie et de l'expertise nécessaires pour ce travail.

La chromogranine B (CGB) / sécrétogranine I est une protéine acide de 626 résidus chez le bœuf (76 kDa) qui subit un grand nombre de clivages protéolytiques dans la matrice des granules de sécrétion des cellules chromaffines de la médullo-surrénale. Notre équipe a préalablement identifié 18 points de clivage (Figure 47) (Strub et coll., 1995).

Bien que la séquence, la maturation et la localisation cellulaire et tissulaire de la CGB soient bien connues et étudiées, l'analyse complète des modifications post-traductionnelles et leur localisation n'avaient pas encore été réalisées (Le Douarin, 1980 ; Nolan et coll., 1985 ; Fischer-Colbrie et coll., 1985b ; Hagn et coll., 1986 ; Fischer-Colbrie et coll., 1986a ; Steiner et coll., 1989 ; Weiler et coll., 1989 ; Strub et coll., 1995 ; Kroesen et coll., 1996 ; Natori et coll., 1998 ; Yoo et coll., 2001 ; Yoo et coll., 2002b et Lukinius et coll., 2003).

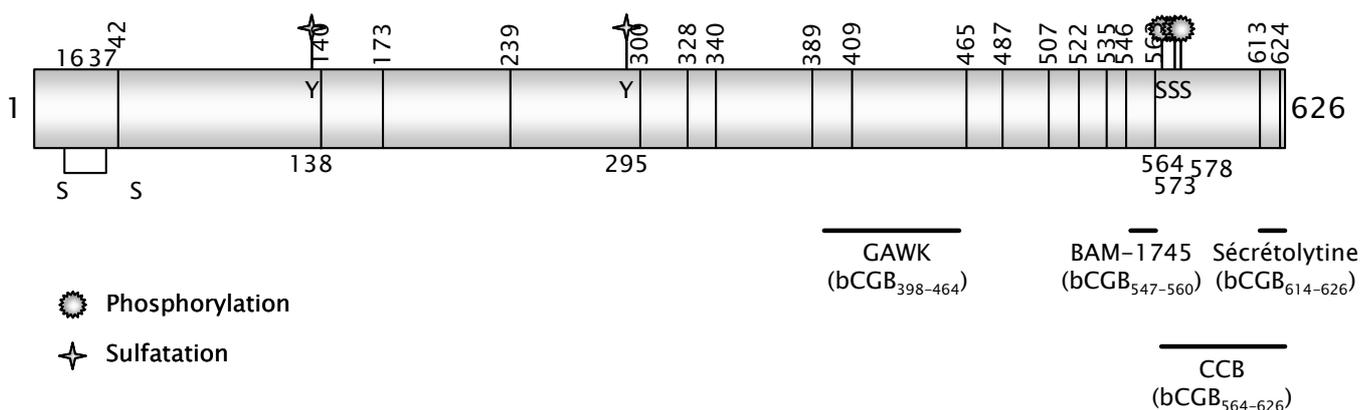


Figure 47 : Localisation sur la séquence de la CGB des modifications post-traductionnelles connues, des sites dibasiques et des peptides dérivés

Contrairement à la CGA, la CGB sécrétée par les cellules chromaffines bovines est presque entièrement dégradée pour générer de très nombreux peptides naturels (Strub et coll., 1995). Seule la sécrétolytine (CGB₆₁₄₋₆₂₆) est connue pour ses activités antimicrobiennes (Strub et coll., 1996a et Strub et coll., 1996b).

II- Résultats acquis avant mon étude

En électrophorèse sur gel dénaturant SDS-PAGE, la distance de migration réelle de la CGB est différente de sa distance théorique, puisqu'elle migre jusqu'à l'équivalent de 100 kDa. Cette différence, observée également pour la chromogranine A (CGA), s'explique par la présence le long de la chaîne peptidique de nombreuses modifications post-traductionnelles (phosphorylations (Sigafos et coll., 1993 et Dahma et coll., 2001), sulfatations (Rosa et coll., 1985 et Niehrs et coll., 1990) et glycosylations (Falkensammer et coll., 1985)), mais aussi par la composition même de la protéine, riche en résidus acides (D 4.6% et E 16.5%). L'ensemble de ces facteurs est responsable du ralentissement de la migration pendant l'électrophorèse SDS-PAGE.

Depuis quelques années, une nouvelle approche a été développée pour permettre l'identification des modifications post-traductionnelles (phosphorylations, glycosylations, sulfatations). Elle inclut des analyses protéomiques, du séquençage et de la spectrométrie de masse. Une étude a montré que, chez le porc, les résidus S₅₈₆, S₅₉₅ et S₆₀₀ de la CGB sont phosphorylés (Wang, Vandenberghe et al. 2001). Les oligosaccharides agissent sur la

croissance, la fonction et la survie d'un organisme par des événements de reconnaissance spécifique ou en modulant des processus biologiques. La présence d'oligosaccharides sur les glycoprotéines peut servir à protéger la chaîne polypeptidique de la reconnaissance par des protéases ou des anticorps et peut affecter leur renouvellement ou leur temps de demi-vie. Les oligosaccharides sont également impliqués dans l'initiation du repliement du polypeptide dans le réticulum endoplasmique ainsi que dans le maintien de la conformation et la solubilité de la protéine. Il a été établi que les sulfatations sur les tyrosines des protéines sécrétées se produisent dans le complexe golgien au niveau du *Trans cisternae*, le compartiment jouant un rôle clé dans l'emballage des peptides. Dans le premier chapitre de cette thèse, nous allons présenter des données plus précises concernant la localisation des modifications post-traductionnelles de la CGB.

La maturation protéolytique de la CGB ainsi que les caractéristiques biochimiques de ses peptides dérivés peuvent être fortement influencées par la présence et la localisation des modifications post-traductionnelles. Ainsi, les peptides générés se caractérisent par une grande variété structurale pouvant influencer leurs activités biologiques (Strub et coll., 1996a). De plus, il est prouvé que les modifications post-traductionnelles sont le reflet d'un état physiologique ; par exemple, notre équipe a montré que dans les états tumoraux, les glycosylations de la CGA étaient modifiées (Gadroy et coll., 1998). Les chromogranines A et B sont des marqueurs de désordres physiologiques : tumeurs (Sobol et coll., 1986 ; Sekiya et coll., 1989 ; Eriksson et coll., 1990 et Deftos, 1991) et maladies neurodégénératives (Doh-ura et coll., 1995 ; Miller et coll., 1996 ; Landén et coll., 1999 et Rangon et coll., 2003) et, dans ce contexte, l'analyse de leurs modifications post-traductionnelles est très informative.

Pour approfondir le rôle biologique de la CGB en tant que marqueur physiopathologique, il est important de caractériser et localiser ses modifications post-traductionnelles. De plus, la grande diversité des modifications post-traductionnelles de la CGB sommairement décrites depuis 1993 (Dillen et coll., 1993) incitent à étudier cette protéine comme un modèle pour une analyse protéomique.

III- Principaux résultats

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude ont donné lieu à une publication :

1 – Publication 1

Characterization and location of post-translational modifications on chromogranin B from bovine adrenal medullary chromaffin granules. Gasnier C, Lugardon K, Ruh O, Strub JM, Aunis D, Metz-Boutigue MH. Proteomics. 2004 Jun;4(6):1789-801, présentée ci-après. Les figures citées dans ce chapitre sont celles présentées dans la publication.

2 – Stratégie expérimentale

Dans cette étude, nous avons utilisé la combinaison de plusieurs techniques d'analyse protéomique : électrophorèse bidimensionnelle, Western blot, HPLC, séquençage automatique d'Edman, analyse des sucres par chromatographie gazeuse, spectrométrie de masse (ESI, et MALDI-TOF), et des logiciels de prédiction de localisation des modifications post-traductionnelles de la CGB.

Nous avons tout d'abord purifié la CGB naturelle présente dans les granules de sécrétion des cellules chromaffines de la médullo-surrénale bovine. Lors de ces étapes de purification, en plus de la protéine entière, deux fragments naturels ont été isolés : un fragment N-terminal et un fragment C-terminal. C'est pourquoi, nous avons scindé l'étude des modifications post-traductionnelles de la CGB en trois étapes : l'étude de la protéine entière, puis l'étude du fragment N-terminal et enfin l'étude du fragment C-terminal.

a – Electrophorèse bidimensionnelle

La CGB est génératrice de nombreux peptides naturels, chacun pouvant avoir une fonction biologique propre et dépendante des modifications post-traductionnelles (article figure 1). L'abondance de ces modifications post-traductionnelles est visualisée grâce à un gel d'électrophorèse bidimensionnelle (article figure 2). Après électrotransfert sur membrane de PVDF, il a été possible de localiser les différents fragments naturels de la CGB par Western blot grâce à deux anticorps polyclonaux anti-CGB₆₁₄₋₆₂₆ et anti-CGB₅₄₇₋₅₆₀. Nous avons révélé la présence de 10 chapelets de peptides dérivés de la CGB de masse moléculaire apparente allant de 18 kDa à 100 kDa (ce qui correspond à la protéine entière) et dont les points isoélectriques sont compris entre 4,5 et 5. Ces chapelets sont caractéristiques de la présence

de modifications post traductionnelles telles que des phosphorylations ou des sulfatations qui modifient le point isoélectrique des protéines, mais très peu leur poids moléculaire.

b– Digestion de la CGB par l'endoprotéase Lys–C : analyse des fragments

Après purification de la CGB par chromatographie échangeuse de cations, nous avons digéré la protéine entière par l'endoprotéase Lys-C et séparé les peptides obtenus par chromatographie de phase inverse (article figure 3). Les peptides obtenus ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF et séquencés par la méthode automatique d'Edman. Les modifications ainsi localisées sont présentées dans la figure 4. Ainsi, lorsqu'une différence est observée entre les masses théoriques et les masses expérimentales, les peptides correspondants sont retenus pour une analyse des modifications post-traductionnelles. Nous avons montré la présence de 7 phosphorylations, 2 sulfatations et 2 acides pyroglutamiques.

c– Analyse du fragment naturel CGB₁₋₁₉₂

Puis nous avons centré notre étude sur le peptide naturel N-terminal CGB₁₋₁₉₁. Ce peptide a été purifié par HPLC (article figure 5), avant d'être digéré par l'endoprotéase Lys-C et analysé en LC/MS, ce qui a permis de mettre en évidence la présence de groupements glycaniques composés de galactose, N-acétylgalactosamine, acide sialique, mannose et fucose (article figure 6), grâce à une séparation par chromatographie gazeuse suivie d'une détection par spectrométrie de masse (FAB).

d– Analyse du fragment naturel CGB₅₆₄₋₆₂₆

Dans une troisième étape, l'étude s'est portée sur l'analyse du fragment naturel C-terminal CGB₅₆₄₋₆₂₆ majoritairement généré et isolé lors de la chromatographie présentée en figure 5 de l'article. Une analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF permet de mettre en évidence des formes variables du peptide avec plusieurs états de phosphorylation (0, 1, 2), ainsi que l'existence d'un polymorphisme M/V en position 577 (article figures 7 et 8). La caractérisation et la localisation des phosphorylations sur le fragment CGB₅₆₄₋₆₂₆ sont présentées dans la figure 8 de l'article ; cette étude a été réalisée grâce à la combinaison d'une purification par HPLC suivie d'une analyse par MALDI-TOF.

La grande conservation de la séquence de la CGB au sein de différentes espèces montre la grande similitude des domaines N- et C-terminaux (article figure 9). Ce sont ces parties qui comportent le plus de modifications post-traductionnelles et qui sont générées

majoritairement. L'ensemble de ces résultats suggère l'importance de ces domaines dans la réponse physiologique au stress.

IV- Discussion–Conclusions

Ce travail, long et difficile, initié par K. Lugardon, a nécessité deux ans de travail pour parvenir à localiser 18 modifications post-traductionnelles sur la CGB issue des granules de sécrétion des cellules chromaffines de la médullo-surrénale bovine : 13 sites de phosphorylation, 1 site de sulfatation, 2 sites de O-glycosylation, 1 site de N-glycosylation, 1 amidation C terminale, des oxydations sur les méthionines, 2 acides glutamiques pyrrolydones, et enfin 1 polymorphisme M/V en position 577 (article figure 10).

a– Les phosphorylations

Parmi l'ensemble des modifications post-traductionnelles ainsi mises en évidence, les sites de phosphorylation sont très majoritaires. Les phosphorylations représentent des modifications post-traductionnelles réversibles cruciales car reliées à des modulations de fonctions physiologiques. Pour la CGA par exemple, l'activité antimicrobienne de la chromacine est directement liée à la présence d'une O-glycosylation sur le résidu S₁₈₆ et/ou de la phosphorylation du résidu T₁₇₃ (Strub et coll., 1996b). De même, l'activité antibactérienne de l'enkélytine est liée à la phosphorylation du peptide sur les résidus S₂₂₁ et S₂₂₃ (Goumon et coll., 1996). Les sites de phosphorylation qui sont impliqués dans la maturation protéolytique des protéines sont adjacents ou très proches des points de clivage importants. En effet leur présence ou leur absence jouera un rôle dans la reconnaissance du site spécifique de clivage par les endoprotéases. Par exemple, la phosphorylation du résidu S₈₁ de la vasostatine II (CGA₁₋₁₁₃) inhibe la formation de la vasostatine I dans les cellules chromaffines (Zhang et coll., 1997). Ainsi, les phosphorylations peuvent jouer un rôle fondamental dans les fonctions biologiques des peptides dérivés. De même, les phosphorylations peuvent être caractéristiques d'un état physiologique et, de ce fait, utilisées comme marqueurs tumoraux, comme par exemple la phosphorylation du fragment 368-417 de la CGB humaine dans les cas de phéochromocytomes (Dahma et coll., 2001).

b– Les glycosylations

Les oligosaccharides sont importants dans le développement, la fonction et la survie des organismes en permettant la modulation des processus biologiques, et des reconnaissances spécifiques. Le greffage des oligosaccharides sur une chaîne peptidique permet de la protéger des enzymes de dégradation ou des anticorps et, par conséquent, d'augmenter le temps de

demi-vie des peptides greffés. Les oligosaccharides jouent également un rôle dans le maintien de la conformation des protéines, et leur solubilité. Nous avons montré que la CGB comporte deux sites de O-glycosylation avec un groupement glycanique déjà décrit sur la CGA par notre équipe (Strub et coll., 1997 et Gadroy et coll., 1998) et correspondant à l'enchaînement N-acétylgalactosamine-galactose-acide sialique. Ces deux glycosylations se placent dans la partie N-terminale de la protéine (T₉₃ et T₁₇₀). La possibilité d'une N-glycosylation a déjà été rapportée (Fischer-Colbrie et coll., 1982) ; en effet, les séquences humaines, bovines et murines de la CGB comportent un site consensus de N-glycosylation (N X T/S). Dans la littérature, une référence concernant la présence d'une N-glycosylation portée par la SgIII de *Xenopus laevis* (protéine appartenant à la famille des granines) est déjà parue (Holthuis et coll., 1996a et Glombik et coll., 1999).

c- Les sulfatations

Les sulfatations des tyrosines sont des modifications covalentes qui ont lieu dans l'appareil de Golgi au niveau de la *trans cisternae*. Ce compartiment joue un rôle important dans le regroupement des peptides de régulation dans les granules de sécrétion (Huttner, 1982 et Hille et coll., 1984). Le rôle biologique des sulfatations n'est pas encore clairement établi. Dans cette étude, nous avons mis en évidence la présence de deux résidus de tyrosine sulfatés Y₄₂₁ et Y₅₁₅.

d- Les oxydations

L'oxydation des méthionines pourrait être, d'une part, un composant important des voies de transduction de signal et d'autre part, peut changer la fonction d'une protéine. Les oxydations peuvent être liées à l'accumulation et aux défauts de fonctionnement de diverses protéines. Elles peuvent donc être impliquées dans certaines maladies et dans le vieillissement cellulaire (Moskovitz, 2005). Des oxydations sont retrouvées sur des résidus de méthionine de la CGB. Cependant, il est difficile de discriminer les oxydations produites au niveau de la cellule chromaffine, de celles dues aux conditions de stockage du matériel.

e- Le polymorphisme M/V

Le polymorphisme en position 577 est une découverte très intéressante, en effet, la mutation M/V a été associée à une susceptibilité de développer divers troubles tels que :

- la thalassémie avec une mutation de l'hémoglobine (Coleman et coll., 1995),
- le syndrome de Sjögren avec une mutation de TAP (Kumagai et coll., 1997),

- une thrombose profonde des veines avec une mutation de la protéine C (Song et coll., 1999),
- une galactosémie avec une mutation de l'enzyme UDP galactose-4 épimérase (Wohlers et coll., 2000),
- la diminution de la neurovirulence du poliovirus (De Jesus et coll., 2005),
- une influence sur le taux de provirus VIH-1 dans les CD4⁺ circulants (Mohey et coll., 2005),
- une insomnie familiale et une susceptibilité pour le développement du désordre de Creutzfeld-Jakob sporadique ou acquis avec une mutation dans le gène du prion (Marcaud et coll., 2003).

Un autre exemple de cette mutation est rapporté pour le BDNF (Egan et coll., 2003) indiquant que le polymorphisme M/V joue un rôle dans la mémoire chez l'homme, la fonction hippocampique en agissant sur la sécrétion et le trafic intracellulaire. Récemment, notre équipe a été associée à un travail montrant que l'immunoréactivité de la CGB était sélectivement associée au processus neurodégénératif de la maladie de Creutzfeld-Jakob (Rangon et coll., 2003). Dans l'ensemble, le polymorphisme M/V nouvellement découvert, pourrait être important pour caractériser l'isoforme de la CGB présent dans les dépôts résultant de l'accumulation d'une isoforme pathologique (PrP CJD) de la protéine prion PrP dans le cerveau humain.

f- Conclusion

Ainsi, l'ensemble de ces résultats permet de mettre en lumière la complexité du mélange constitué par les peptides naturellement générés par la CGB, protéine reconnue comme marqueur du système neuroendocrine. Un taux élevé de GAWK (hCGB₄₂₀₋₄₉₃) est souvent retrouvé chez des patients atteints de tumeurs pancréatiques (Sekiya et coll., 1989). De même, la CGB est considérée comme un marqueur de néoplasie de la glande parathyroïde (Khan et coll., 2003), et comme marqueur de phéochromocytomes (Stridsberg et coll., 1997 et Portela-Gomes et coll., 2004). L'ensemble de ces modifications post-traductionnelles peut jouer un rôle important dans la maturation protéolytique de cette protéine en peptides bioactifs, et également dans les activités biologiques liées aux peptides issus de cette maturation et impliqués dans des processus neurodégénératifs, la modulation hormonale ou l'immunité innée. En relation avec les résultats obtenus dans notre groupe, des activités antibactériennes sont décrites pour les fragments CCB (CGB₅₆₂₋₆₂₆) et la sécrétolytine. La présence de trois phosphorylations possibles sur le fragment CCB induit une hétérogénéité de

ce peptide précurseur de la sécrétolytine et à l'heure actuelle, nous ne pouvons pas préciser la ou les formes responsables de l'activité antibactérienne.

V- Perspectives

Pour compléter les études structurales que j'ai réalisées, il serait intéressant de poursuivre cette étude chez l'homme. Ainsi, localiser les modifications post-traductionnelles de la CGB dans les cellules chromaffines humaines, en fonction de différentes pathologies, pourrait permettre de mieux comprendre l'implication des peptides générés naturellement, leur fonction, leur mode d'action et peut-être de découvrir de nouveaux marqueurs de pathologies. Il pourrait être intéressant également d'étudier les variations de ces modifications en fonction des rythmes biologiques, mais aussi de rechercher les fonctions de ces modifications post-traductionnelles, comprendre ce qu'elles modulent, et à quels processus physiologiques elles sont liées.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Characterization and location of post-translational modifications on chromogranin B from bovine adrenal medullary chromaffin granules

Claire Gasnier, Karine Lugardon, Olivier Ruh, Jean-Marc Strub, Dominique Aunis, Marie-Hélène Metz-Boutigue

Proteomics, 2004, Vol. 4, Pages 1789-1801

Pages 1789 à 1801 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/108071070/PDFSTART>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Chapitre II : Analyse protéomique de la maturation protéolytique de la Sécrétogranine II contenue dans les granules de sécrétion des cellules chromaffines de la médullo-surrénale bovine

I- Introduction

Dans le cadre de l'étude des relations structure-fonction des protéines vésiculaires, nous nous sommes intéressés à la maturation protéolytique de la sécrétogranine II contenue dans les granules chromaffines de la médullo-surrénale bovine.

La maturation de cette protéine peu abondante a été très peu étudiée, bien qu'elle induise la formation d'un peptide bien documenté : la sécrétoneurine.

Dans ce chapitre, seront présentées les expériences permettant de dresser une carte des fragments naturels de la SgII présents dans les granules chromaffines bovins et de leurs modifications post-traductionnelles.

Jusqu'à ce jour, la majorité des études structurales liées à la caractérisation des protéines granulaires de la famille des chromogranines/sécrétogranines ont porté sur la CGA et la CGB qui représentent respectivement 80 % et 10 % du matériel intra-granulaire, alors que la SgII n'en représente qu'environ 2 % (Dillen et coll., 1993). Ainsi, la maturation et les modifications post-traductionnelles de la CGA ont été établies il y a plusieurs années par notre équipe (Metz-Boutigue et coll., 1993 et Gadroy et coll., 1998), et la première partie de cette thèse décrit la caractérisation des modifications post-traductionnelles de la CGB (Gasnier et coll., 2004).

La SgII est la protéine précurseur d'un fragment naturel très impliqué dans la neuroimmunité (la sécrétoneurine) (Kähler et coll., 2000 ; Kähler et coll., 2001 ; Dunzendorfer et coll., 2002 ; Kähler et coll., 2002a et Kähler et coll., 2002b). Les chromogranines / sécrétogranines étant des protéines précurseurs de peptides aux nombreuses activités biologiques, nous avons décidé d'établir la cartographie de l'ensemble des peptides dérivés de la SgII et générés dans la matrice des granules chromaffines de la médullo-surrénale.

La Sg II est une protéine acide, dont seuls deux peptides dérivés ont été caractérisés chez le bœuf : la sécrétoneurine (SgII₁₅₁₋₁₈₃) (Kirchmair et coll., 1993) et le peptide C-terminal AMENM (SgII₄₇₉₋₄₈₃) (Soszynski et coll., 1993). Cependant, à l'instar des autres

chromogranines, il est fortement probable que la SgII subisse une maturation protéolytique générant d'autres peptides naturels n'ayant pas encore été caractérisés.

La maturation de la CGA et de la CGB se fait majoritairement au niveau de sites dibasiques. Le clivage au niveau des ces sites, bien caractérisé, est le fruit de deux familles d'enzymes intragranulaires : les prohormones convertases (1, 2 et 3) qui clivent en C-terminal des deux résidus basiques et la carboxypeptidase B qui libère ces résidus basiques C-terminaux. C'est de cette façon que sont produites la sécrétoneurine, avec le clivage des liaisons R₁₅₄-T₁₅₅ et Q₁₈₆-R₁₈₇, et le peptide AMENM (R₅₈₁-A₅₈₂). De même, il a été montré que la SgII de rat subit une maturation par la PC2 dans les lignées de cellules PC12 (Dittie et coll., 1995). De plus, la CGA subit naturellement des clivages au niveau des sites A-L (Metz-Boutigue et coll., 1993 et Seidah et coll., 1999), c'est pourquoi ces sites sont également pris en compte pour notre analyse. Aussi, lorsque la séquence de la SgII est analysée, nous pouvons observer l'existence de plusieurs sites potentiellement à l'origine de la formation des peptides dérivés. La séquence de la SgII et les sites de clivage protéolytique sont indiqués sur la Figure 48.

```

-27  -20  -10  1  10  20  30
MAEAKTH WLGAVLSLIP LIFLLSEAEA ASFQRNQLLQ KEPDLRLENV QRFPSPEMIR

40  50  60  70  80  90
ALEYIEKLRQ QAHKEESSPD YNPYQGVSVP LQOKENGDLP ESSRDSLSED EWMKIIAEAL

100 110 120 130 140 150
RQAENEPQSA PKENKPYTLN SEKNFPMDMP DDYETQQWAE RKLKHMRFPP MYEENSRDNP

160 170 180 190 200 210
FKRTNEIVEE QYTPQNLATL ESVFQELGKL TGPNSQKRER ADEEQKLYTD DEDDIYKANN

220 230 240 250 260 270
IAYEDVVGGE DWNPVVEEKIE SQTQEEVRDS KENADKTEQI NDEMKRSGQL GLQDEDLRKE

280 290 300 310 320 330
SKDQLSDDVS KVITYLKR LV NAAGSGRSQN GQTGERAIRL FEKPLDPQSI YQLIEISRNL

340 350 360 370 380 390
QIPPEDLIDM LKTGEKPVPEP EQELEIPVPEP EDISEVDLDH PDLFQNKMLS KNGYPKAPGH

400 410 420 430 440 450
AVAAEALPEGL SVEDILNLLG MESAANPKPP YFPNQYNREK VLSRLPYGPG RSKANQLPKA

460 470 480 490 500 510
VWMPDVENRQ MAYENLNDKD QELGEYLARM LVKYPEIMNA NPAKRVP SQG STEDDRQDEN

520 530 540 550 560 570
QIEQALKEHL SQHSSQETDK LASVSKRLPV GTPKSDDTPN RPYLDEDLLV KVLEYLNQEK

580 586
AEKGREHIAK RAMENM
    
```

Figure 48 : Séquence de la SgII bovine

En vert : la sécrétoneurine et le peptide AMENM ; en rouge : les sites de clivage ; en orange : le peptide signal et en gris le propeptide.

II- Stratégie expérimentale

Après une électrophorèse bidimensionnelle de matériel intragranulaire bovin, nous avons réalisé une immunodétection à l'aide d'un anticorps polyclonal spécifique du fragment SgII₁₆₅₋₁₈₂. Par comparaison avec une détermination théorique des points de clivage potentiels (expasy.org), un schéma de la maturation protéolytique est proposé. Nous avons prolongé l'analyse par une étude des modifications post-traductionnelles possibles de la SgII (Figure 49).

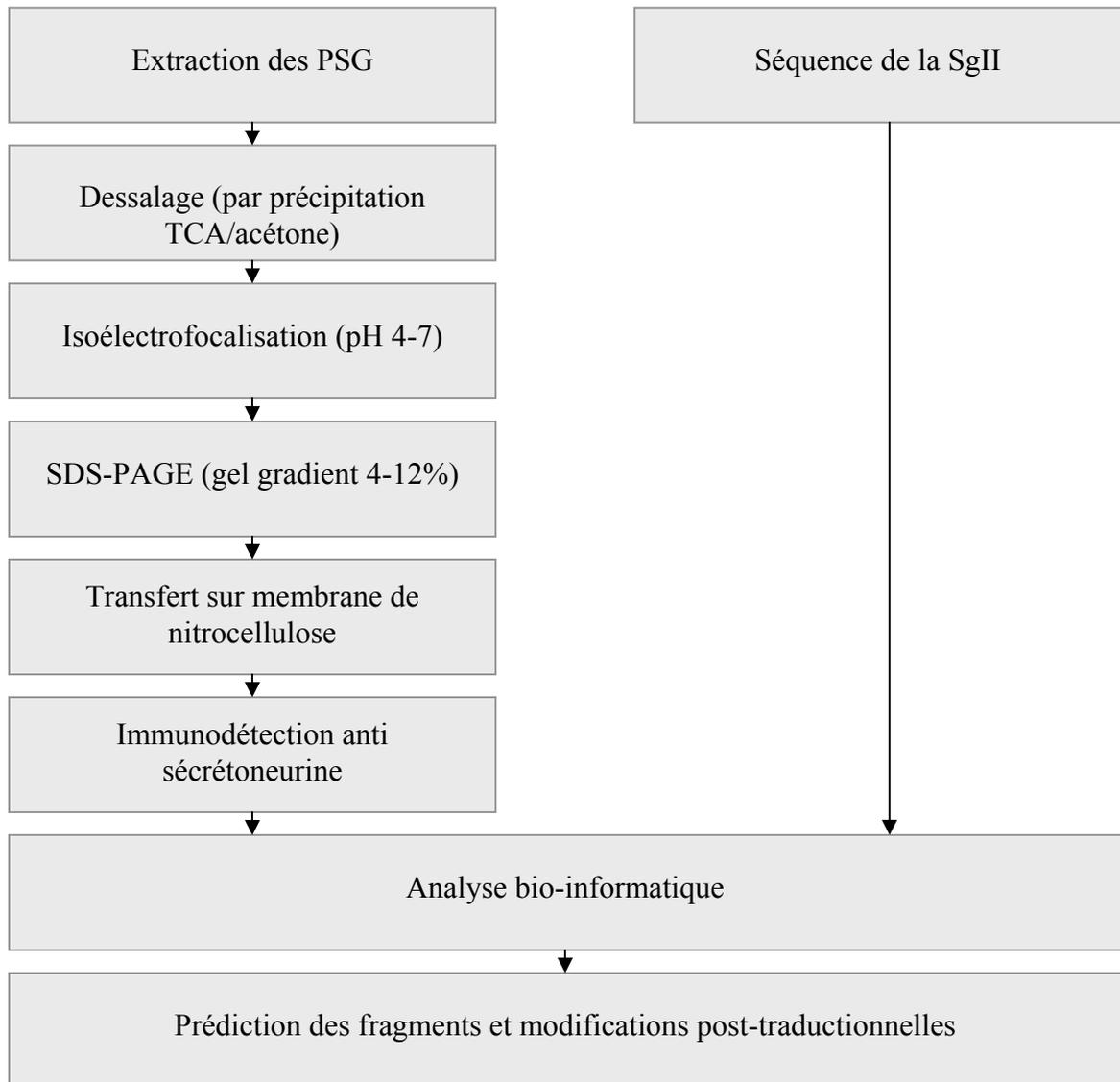


Figure 49 : Stratégie expérimentale

III- Résultats

1- Cartographie des fragments dérivés de la SgII

a- Electrophorèse bidimensionnelle

Afin de visualiser les fragments naturels issus de la SgII, une électrophorèse bidimensionnelle sur des bandelettes de gels d'isoélectrofocalisation de gamme de pH 4-7, puis sur gels précoulés en gradient d'acrylamide 4-12% (Bio-Rad) a été réalisée avec 100 µg de matériel intragranulaire provenant des cellules chromaffines de la médullo-surrénale bovine. Après électrotransfert sur membrane de nitrocellulose, une immunodétection spécifique est effectuée avec un anticorps polyclonal purifié dirigé contre la sécrétoneurine. Cette immunodétection a permis de mettre en avant de nombreux fragments naturels de la SgII dont les points isoélectriques sont compris dans la gamme de pH 4,2-5 (Figure 50). De plus, le profil obtenu est différent de celui de la CGA (Metz-Boutigue 1993) et de la CGB (Strub, 1995), ce qui permet de poser l'hypothèse selon laquelle ce résultat expérimental n'est pas artéfactuel, sachant que les contrôles relatifs à la spécificité de l'anticorps secondaire ont été effectués.

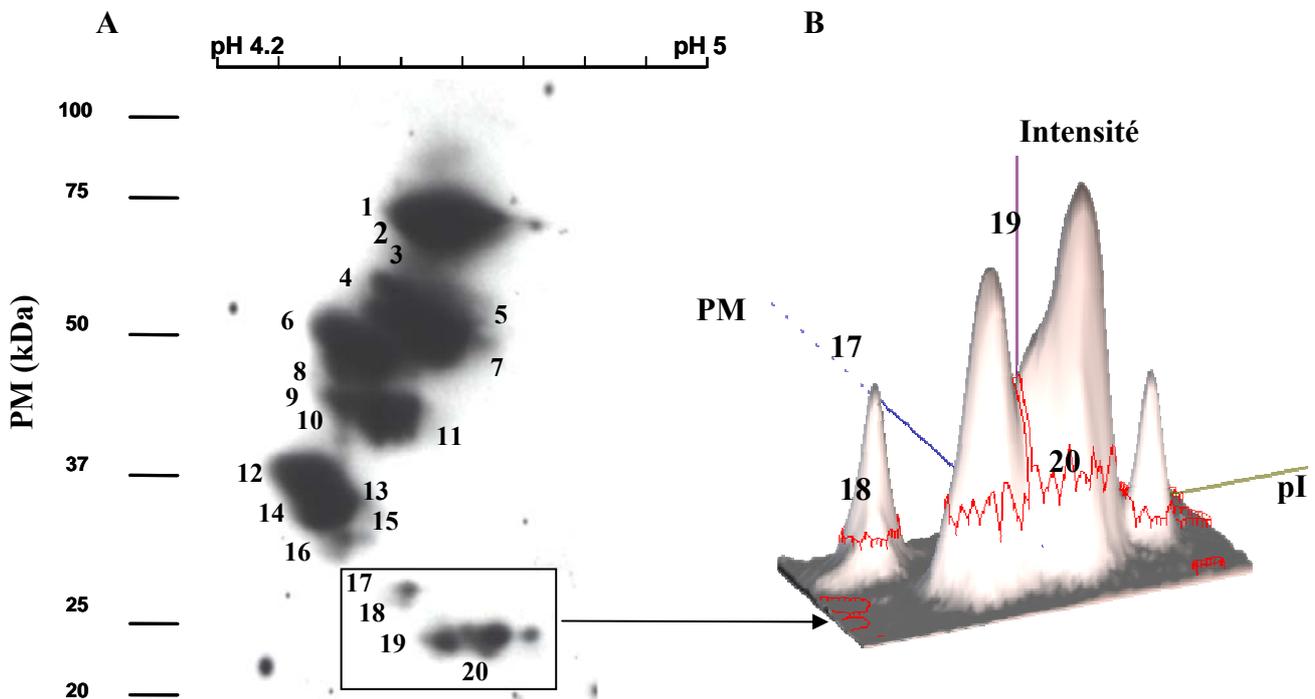


Figure 50 : Immunodétection anti sécrétoneurine réalisée sur une membrane de nitrocellulose issue du transfert d'une électrophorèse bidimensionnelle de protéines solubles de granules chromaffines de la médullo-surrénale bovine (100µg). (A) Zoom sur la partie pH 4,2 – pH 5. (B) Vue tridimensionnelle des spots 17 à 20, en bleu : axe des PM, en vert : axe des pI, en violet : axe de l'intensité, les spots détectés par le logiciel sont entourés en rouge.

Afin d'affiner l'analyse, nous avons centré l'étude sur une gamme restreinte de points isoélectriques, compris entre pH 4 et 5 et cherché à discriminer plus précisément les différents spots obtenus. Après analyse, nous avons mis en évidence vingt séries différentes de spots caractérisés par une immunodétection positive par l'anticorps anti-SgII₁₆₅₋₁₈₂. Nous voyons également un spot très diffus situé à 80 kDa ; ce spot pourrait être de la SgII entière avec des modifications post-traductionnelles qui lui confèrent une grande hétérogénéité. Grâce à une modélisation tridimensionnelle des spots 17 à 20, nous avons pu les visualiser plus clairement. Sur cette vue en trois dimensions, les spots 18 et 20 apparaissent comme des épaulements des spots 17 et 19. Le spot 19 est en fait un chapelet de spots de même masse, mais de points isoélectriques différents.

La protéine entière (spots 1 et 2) semble être aussi abondante que ses fragments (Tableau XII), ce qui laisse supposer que la sécrétogranine II est fortement maturée dans les granules de sécrétion, de la même façon que les autres chromogranines. En effet, nous avons pu mettre en évidence la formation de 20 fragments au moins, dont les points isoélectriques varient entre pH 4,2 et 5 et les masses entre 75 et 22 kDa, et qui sont quantitativement très proches (le fragment le plus abondant ne représentant que 18 % de la totalité des spots).

En comparant les poids moléculaires et les points isoélectriques de ces fragments (reportés dans le Tableau XIII) avec les points isoélectriques et les poids moléculaires théoriques correspondant aux fragments possibles issus des dégradations protéolytiques de la SgII au niveau des sites dibasiques, nous avons pu corrélérer un grand nombre de ces données. Les données analytiques théoriques ont été obtenues grâce à l'utilisation de logiciels d'analyse protéomique disponibles sur le site expasy.org.

Afin de permettre une meilleure comparaison entre les données expérimentales et les données théoriques, celles-ci ont été rapportées graphiquement sous la forme d'une séparation théorique selon leur point isoélectrique et leur poids moléculaire, permettant une visualisation directe de l'emplacement des peptides possibles (Figure 51). Cependant, une restriction doit être émise quand aux masses moléculaires théoriques, car elles ne tiennent pas compte de l'effet de ralentissement de la migration caractéristique des chromogranines. Cet effet est lié au caractère acide, ainsi qu'aux modifications post-traductionnelles de ces protéines.

Tableau XII : Quantification des spots détectés dans la Figure 50

L'aire correspond à la surface du spot, et le volume à l'intensité. Les spots sont classés par ordre décroissant de leur *volume%* (c'est-à-dire l'importance du volume de chaque spot par rapport à la somme de toutes les intensités des spots). Cette quantification a été réalisée à l'aide du logiciel ImageMaster2D Platinum™ de GE Healthcare. Le spot 0 est le spot diffus placé au dessus de la protéine entière dans la Figure 50

Spots	Point isoélectrique (PI)	Poids moléculaire apparent (PM) (kDa)	Aire	Volume	Volume%
5	4,57	55	20,53	47,52	17,82
2	4,55	73	15,08	32,89	12,33
4	4,45	60	16,77	28,51	10,69
6	4,4	50	11,30	18,08	6,78
3	4,55	70	10,27	16,49	6,18
7	4,6	47	9,84	16,46	6,17
8	4,4	45	7,14	12,37	4,64
19	4,6	23	13,85	11,76	4,41
1	4,55	75	8,29	11,11	4,17
10	4,45	40	7,77	11,05	4,14
9	4,4	43	7,40	10,96	4,11
14	4,38	35	6,25	9,67	3,63
15	4,4	34	6,62	9,20	3,45
11	4,5	39	7,08	8,63	3,24
12	4,35	37	6,25	8,06	3,02
13	4,38	36	5,56	7,77	2,92
20	4,65	22	2,98	2,02	0,76
0	4,55	85	7,86	1,53	0,57
16	4,4	30	3,35	1,42	0,53
17	4,5	28	1,69	0,74	0,28
18	4,5	26	1,69	0,38	0,14

Grâce à la Figure 51 et aux données du Tableau XIII, nous avons localisé un certain nombre de fragments protéolytiques possibles pour la sécrétogranine II bovine. Nous avons tenu compte d'un facteur de 1,16 entre la masse moléculaire théorique des fragments et la masse moléculaire réelle, ce facteur correspond à la différence entre la masse théorique de la protéine entière et sa masse expérimentale. En effet, la sécrétogranine II est connue pour être une protéine acide (ce qui est confirmé sur la Figure 50 par la visualisation de son point isoélectrique), et la présence de nombreux résidus acides le long de sa séquence ralentit sa migration sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Ainsi, l'ensemble des peptides mis en évidence sont présentés sur la Figure 52.

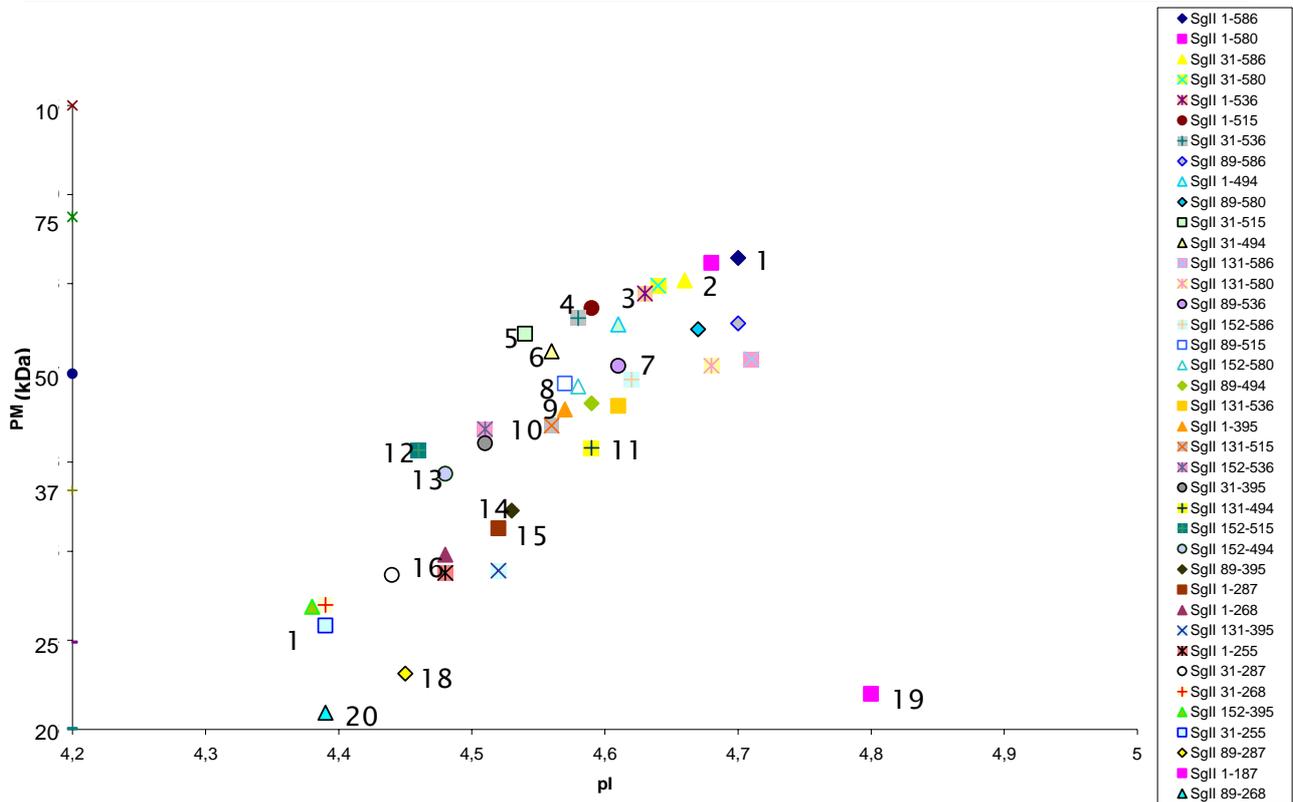


Figure 51 : Visualisation de l'emplacement théorique des fragments issus de la dégradation protéolytique de la sécrétogranine II bovine contenant le fragment sécrétoneurine

Tableau XIII : Points isoélectriques et masses moléculaires mesurés pour les spots détectés sur le film d'immunodétection

Spots	Point isoélectrique (PI)	Poids moléculaire apparent (PM) (kDa)
1	4.55	75
2	4.55	73
3	4.55	70
4	4.45	60
5	4.57	55
6	4.4	50
7	4.6	47
8	4.4	45
9	4.4	43
10	4.45	40
11	4.5	39
12	4.35	37
13	4.38	36
14	4.38	35
15	4.4	34
16	4.4	30
17	4.5	28
18	4.5	26
19	4.6	23
20	4.65	22

b- Identification des différents fragments dérivés de la Sg II

L'analyse des fragments présente parfois des redondances, c'est-à-dire que plusieurs fragments possibles peuvent être à l'origine d'un spot ; lorsqu'il ne nous a pas été possible de déterminer quel était le fragment impliqué, tous les cas ont été représentés. De plus, certains spots sont caractérisés par une masse moléculaire correcte, mais avec des points isoélectriques différents. Ces spots présentent des chapelets caractéristiques de la présence de modifications post-traductionnelles, dont nous discuterons la localisation dans une seconde partie.

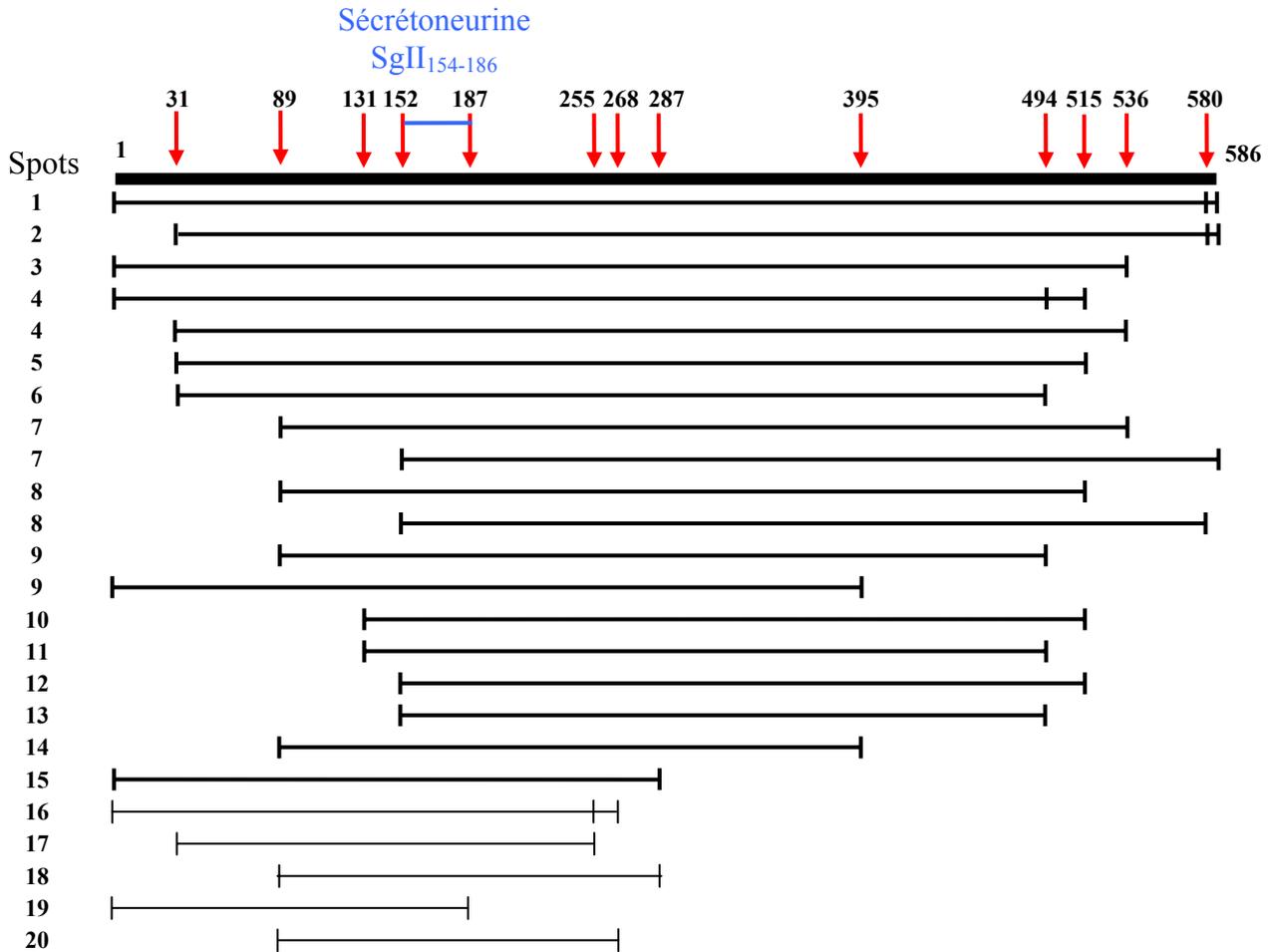


Figure 52 : Représentation des fragments possibles issus de la maturation de la SgII bovine

Flèches rouges : localisation des sites de clivage. En bleu : la partie immunodétectée SgII₁₅₄₋₁₈₆. Les fragments moins abondants sont représentés en traits plus fins

Il est intéressant de noter que certains points de clivage potentiels ne sont utilisés que pour un seul peptide ; de ce fait, ces points de clivage semblent beaucoup moins propices à la maturation, c'est le cas des points 255, 268, 287 et 395. En 255, la séquence au niveau du point de clivage est EMKRSG, or la coupure entre R et S n'est pas favorable, il en est de

même pour les coupures en 268 et 287 (séquences DLRKES et YLKRLV). En 395, c'est un site de coupure A-L, or la séquence VAEALP contient une proline ; cet acide aminé n'est pas favorable à l'action des endoprotéases car il génère des coudes dans la structure de la protéine, rendant difficile l'action des enzymes.

Grâce à cette étude, nous avons pu mettre en évidence un certain nombre de points de clivage, détaillés et listés dans le Tableau XIV.

Au vu des résultats obtenus, il semblerait que l'ensemble des points de clivage potentiels soient utilisés pour la maturation protéolytique.

Tableau XIV : Liste des points de clivage détectés, ainsi que les liaisons dans lesquelles ils sont impliqués

Points de clivage	Séquence
31	MIRA ↓ LE
89	IAEA ↓ LR
131	AERK ↓ LK
152	PFKR ↓ TN
187	SQKR ↓ ER
255	EMKR ↓ SG
268	DLRK ↓ ES
287	YLKR ↓ LV
395	VAEA ↓ LP
494	PAKR ↓ VP
515	IEQA ↓ LK
536	VSKR ↓ LP
580	IAKR ↓ AM

2- Recherche et localisation des modifications post-traductionnelles

Afin de compléter l'analyse de la Sg II bovine, présente dans les granules de sécrétion des cellules chromaffines, nous avons cherché à localiser d'éventuelles modifications post-traductionnelles.

Grâce à l'utilisation de logiciels d'analyse protéomique disponibles sur expasy.org (NetOGly, NetNGly, NetPhos, Sulfinator), nous avons pu localiser : dix-sept sites de phosphorylation, quatre sites de sulfatation, et aucun site de O- ou N-glycosylation. Ces sites sont référencés dans le Tableau XV.

Tableau XV : Bilan des sites possibles de modifications post-traductionnelles de la SgII
 En bleu : sites de phosphorylation par la CK2 ; vert : sites de phosphorylation par la PKC ; rouge : sites de sulfatation.

Phosphorylations				Sulfatations	
Caséine kinase 2		Protéine kinase C			
Localisation	Séquence	Localisation	Séquence	Localisation	Séquence
47	KEE S SPD	72	LP E S S RD	123	PDD Y ETQ
72	LP E S S RD	111	TLN S EKN	198	QKL Y TDD
76	SRD S L S E	185	GP N S S QKR	206	DDI Y KAN
78	D S L S EDE	295	AAG S GRS	553	NR P Y L DE
199	KL Y T D DDE	528	SQ E T D KL		
233	ESQ T QEE	535	ASV S KRL		
364	EDI S EVD	542	PVG T PKS		
401	EGL S VED				
501	SQG S TED				
502	QG S TEDD				
524	SQH S SQE				

La SgII peut être phosphorylée par la caséine Kinase 2 (CK2) (enzyme présente dans les cellules chromaffines) (Ehrnsperger et coll., 2001 et Lee et coll., 2006). La CK2 a pour site consensus de phosphorylation : [ST] x2 [DE] (S ou T est le site de phosphorylation). Cependant, il existe un certain nombre de conditions qui modulent l'activité de cette enzyme (Pinna, 1990). Ces restrictions sont :

- en conditions identiques, la sérine est favorisée par rapport à la thréonine,
- un acide aminé acide (acide aspartique ou acide glutamique) doit se trouver à une distance de trois résidus côté C-terminal du résidu phosphorylé,
- la présence de résidus acides supplémentaires en position +1, +2, +4 et +5 augmente le taux de phosphorylation (la majorité des substrats physiologiques ont au moins un résidu acide dans une de ces positions),
- un acide aspartique sera préférable à un acide glutamique en +1, +2, +4 et +5,
- la présence d'un résidu basique en N-terminal du site accepteur diminue le taux de phosphorylation, tandis qu'un résidu acide l'augmente.

En se basant sur ces restrictions, les sites de phosphorylation les plus probables sont les sites 76, 78, 199, 364 et 501.

Dans les cellules chromaffines se trouve une autre kinase : la protéine kinase C (PKC) (Lee et coll., 2006). La PKC a pour séquence consensus : [ST] - x - [RK]. *In vivo*, la PKC

phosphoryle préférentiellement les sérines ou thréonines situées près d'un résidu basique (côté C-terminal). La présence en N- et C-terminal de l'acide aminé, cible d'un résidu basique, augmente la V_{max} et le K_m de la réaction de phosphorylation (Kishimoto et coll., 1985 et Woodgett et coll., 1986). En considérant ces données, le résidu 535 a de plus fortes chances d'être phosphorylé par la PKC.

Au sein de l'appareil de Golgi des cellules chromaffines, la SgII peut également subir des sulfatations. Il est connu que la SgII humaine est sulfatée en position 124 (Huttner et coll., 1991), ce qui correspond (par homologie de séquence) à la position 123 de la SgII bovine. Il existe différents critères qui permettent de déterminer les régions potentiellement sulfatées (Huttner, 1987a ; Rosenquist et coll., 1993 et Nicholas et coll., 1999). Une région potentiellement sulfatée présente :

- un résidu acide (acide aspartique ou acide glutamique) à moins de deux résidus de la tyrosine (typiquement à -1),
- au moins trois résidus acides de -5 à +5,
- pas plus d'un résidu basique et trois résidus hydrophobes de -5 à +5,
- des résidus favorisant le démarrage d'hélice : au moins une proline ou une glycine (les acides aminés avec le potentiel de tour le plus fort) de -7 à -2 et de +1 à +7,
- au moins deux ou trois acides aspartiques, sérines ou asparagines de -7 à +7,
- aucun résidu cystéine impliqués dans des ponts disulfure de -7 à +7,
- aucun N- glycanes proches de la tyrosine.

En tenant compte de ces restrictions, le site en 123 a une forte probabilité d'être sulfaté, ce qui est également le cas des sites 206 et 553, mais avec une probabilité moindre.

Il faut noter que la sulfatation des tyrosines est physiologiquement possible seulement pour les protéines dont la maturation passe par le lumen de l'appareil de Golgi, ce qui est le cas de la SgII (Muller et coll., 1997).

Les sites potentiels de modifications post-traductionnelles et les fragments de maturation de la SgII peuvent être présentés sur une même figure (Figure 53). L'analyse de la Figure 53 met en évidence une majorité des sites potentiels de phosphorylation situés dans les parties N- et C-terminales de la protéine, la partie médiane n'apparaissant que peu modifiée.

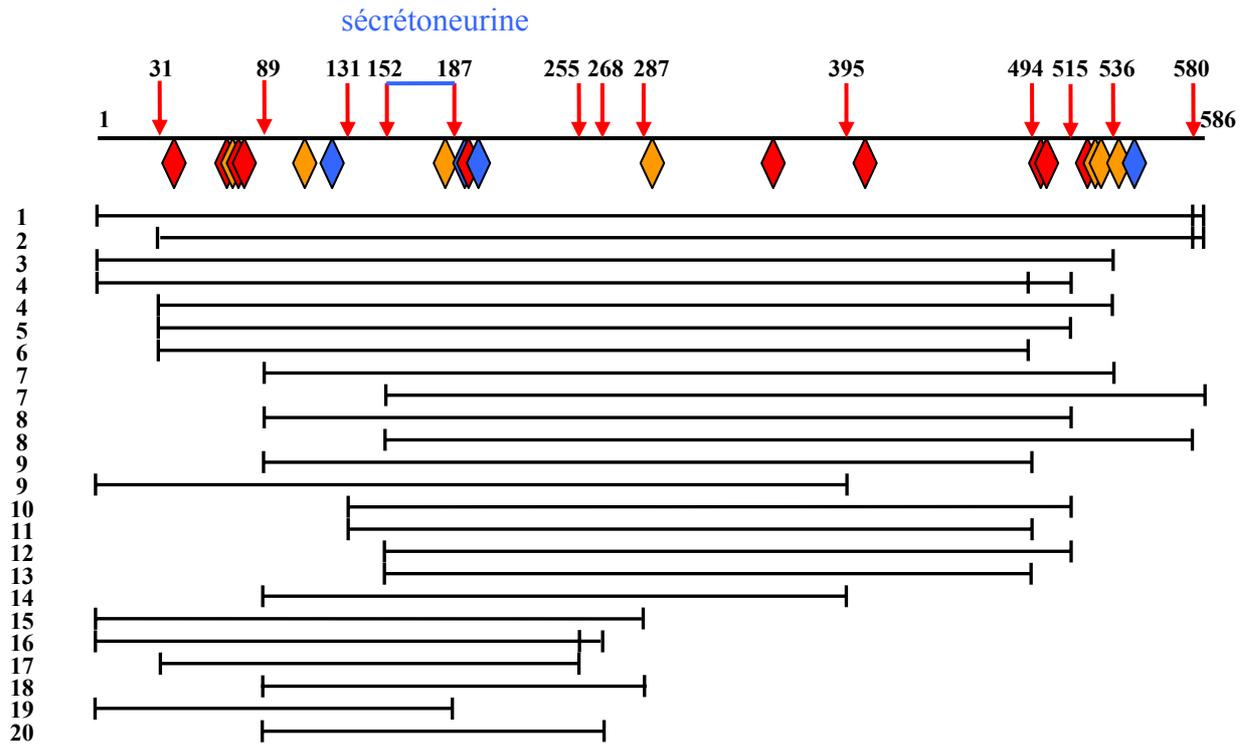


Figure 53 : Localisation des modifications post-traductionnelles potentielles de la sécrétogranine II bovine

Flèches rouges : points de clivage ; trapèzes rouges : sites potentiels de phosphorylation par la Caséine Kinase 2 ; orange : sites potentiels de phosphorylation par la Protéine Kinase C ; bleu : sites potentiels de sulfatation

En comparant les Figure 50 et Figure 53, il est possible de proposer des fragments porteurs de modifications post-traductionnelles. Ainsi sur la Figure 50, on constate que les fragments caractérisés par des chapelets de spots sont les fragments 10, 11 et 19, de même les fragments 1, 6, 14, 18, 19 et 20 présentent des variations de point isoélectriques plus élevée que la théorie (Tableau XVI). La moyenne des déviations entre les valeurs expérimentales de pI et les valeurs théoriques est assez importante : 0,12 (écart type : 0,05), ce qui peut se traduire par le fait que la majorité des fragments issus de la maturation de la SgII sont modifiés.

Par analogie avec l'humain, nous pouvons émettre l'hypothèse que la tyrosine 123 est sulfatée. Ce résidu intervient dans tous les fragments sauf les fragments 10 à 13. Mais elle ne peut pas à elle seule expliquer les variations de points isoélectriques et surtout les chapelets de spots visibles pour le spot 19. De ce fait, il semble que d'autres modifications post-traductionnelles soient présentes, et en particulier dans les régions C-terminales. Cependant, il est nécessaire de poursuivre cette étude afin de caractériser avec certitude ces

modifications, et également de visualiser les chapelets de spots obtenus avec un anticorps spécifique de la région N-terminale de la protéine.

Tableau XVI : Comparaison des pI et MW des peptides issus de la maturation de la SgII, choisis pour leur aptitude à être modifiés

Spots	pI théorique	pI expérimental	MW théorique	MW expérimental	Différence pI expérimental pI théorique (valeur absolue)
1	4.55	4.7	75	68	0,15
2	4.55	4.66	73	64	0,11
3	4.55	4.63	70	62	0,08
4	4.45	4.59	60	59	0,14
4	4.45	4.58	60	58	0,13
4	4.45	4.61	60	57	0,16
5	4.57	4.54	55	55	0,03
6	4.4	4.56	50	53	0,16
7	4.6	4.61	47	51	0,01
7	4.6	4.62	47	49	0,02
8	4.4	4.57	45	49	0,17
8	4.4	4.58	45	48	0,18
9	4.4	4.59	43	46	0,19
9	4.4	4.57	43	45	0,17
10	4.45	4.56	40	44	0,11
11	4.5	4.59	39	41	0,09
12	4.35	4.46	37	41	0,11
13	4.38	4.48	36	38	0,1
14	4.38	4.53	35	35	0,15
15	4.4	4.52	34	34	0,12
16	4.4	4.48	30	32	0,08
16	4.4	4.48	30	30	0,08
17	4.5	4.39	28	26	0,11
18	4.5	4.45	26	23	0,05
19	4.6	4.8	23	22	0,2
20	4.65	4.39	22	20	0,26

IV- Conclusion

Cette étude a permis de dresser une carte des fragments issus de la maturation protéolytique de la SgII. Cette carte doit être complétée par une série d'expériences visant à caractériser chaque fragment potentiel : analyse de la séquence N-terminale des fragments, analyse de la longueur des fragments et localisation des modifications post-traductionnelles grâce à la spectrométrie de masse.

L'étude des fragments potentiellement modifiés -10, 11, 18, 19, 20- pourrait être réalisée grâce à l'excision de spots du gel, et identification des modifications post-traductionnelles par LC/MS réalisée sur digestion trypsique.

Au vu des résultats obtenus en électrophorèse bidimensionnelle, la SgII apparaît comme une protéine modifiée, de la même façon que les autres chromogranines. Les sites de prédiction de modifications potentielles donnent pour cette protéine dix-sept sites de phosphorylation et quatre sites de sulfatation. Ces résultats potentiels sont corroborés par les résultats expérimentaux. En effet, sur la Figure 50 la présence de chapelets de taches, dans la zone des bas poids moléculaires, caractéristiques de la présence de modifications post-traductionnelles peut être mise en avant.

La caractérisation et la localisation des modifications post-traductionnelles prennent tout leur essor dans la recherche des fonctionnalités de la SgII et de ses peptides dérivés, ainsi que dans sa régulation. En effet, la carte que nous venons de présenter est caractéristique d'un organisme et d'un organe donnés, sans pathologie ; or les chromogranines sont connues pour être des marqueurs de pathologies. Ainsi il serait intéressant de rechercher les modifications post-traductionnelles et les profils de maturation de la SgII dans différents tissus et fluides biologiques sains ou pathologiques. De plus, nous allons montrer dans le chapitre suivant que la SgII peut être à l'origine de peptides à activités antimicrobiennes. L'action de ces peptides pourrait être modulée en fonction de l'état physiologique des cellules et par conséquent du profil des modifications post-traductionnelles de la SgII.

Chapitre III : Mise en évidence de l'existence de peptides à activités antimicrobiennes et antifongiques dérivés de la sécrétogranine II

I- Introduction

Les deux principales chromogranines que sont la CGA et la CGB ont été caractérisées comme protéines précurseurs de peptides à activité antimicrobienne. Ainsi, la CGA est le précurseur de cinq peptides antimicrobiens : la vasostatine-I (CGAb₁₋₇₆), la chromofungine (CGAb₄₇₋₆₆) (Lugardon et coll., 2001), la prochromacine (CGAb₇₉₋₄₃₁), la chromacine (CGAb₁₇₃₋₁₉₄) (Strub et coll., 1996a), et la catestatine (CGAb₃₄₄₋₃₆₄) (Briolat et coll., 2005). La sécrétolytine (CGBb₆₁₄₋₆₂₆), de même que son précurseur le CCB (CGB₅₆₄₋₆₂₆) (Strub et coll., 1995), sont deux peptides antimicrobiens dérivés de la CGB. Nous venons de montrer que la SgII, protéine appartenant également à la famille des chromogranines, est à l'origine de nombreux peptides issus de sa maturation protéolytique. C'est pourquoi nous avons cherché à examiner si cette protéine est génératrice de nouveaux peptides à activité antimicrobienne.

II- Stratégie expérimentale

Ce chapitre présente les trois démarches expérimentales que nous avons menées en parallèle (Tableau XVII).

Tableau XVII : Démarches expérimentales

Etapes	But	Techniques
1	Recherche de peptides antimicrobiens naturels issus de la Sg II contenue dans les PSG	- HPLC - Tests antimicrobiens
2	Analyse de l'activité antimicrobienne de la sécrétoneurine et du peptide AMENM	- Synthèse de sécrétoneurine - Tests antimicrobiens
3	Examen de la séquence de la SgII bovine Etude des quatre peptides sélectionnés	- Logiciels d'analyse bio-informatiques - Tests antimicrobiens sur différentes souches - Microscopie

III- Résultats

1 – Recherche de peptides antimicrobiens naturels

Afin de déterminer la présence de peptides antimicrobiens naturellement issus de la SgII présente dans le matériel intragranulaire des cellules chromaffines, une purification de ce matériel par chromatographie a été réalisée. Une première étape de purification par chromatographie d'exclusion a permis de récupérer des fractions contenant la SgII (Figure 54) (fractions détectées par Dot blot), ces fractions marquées en vert sur la figure ont été rassemblées et de nouveau purifiées par chromatographie HPLC (Figure 55).

L'activité antimicrobienne des fractions obtenues a été testée, cependant aucune fraction contenant la SgII n'a révélé d'activité. Nous avons décidé de changer l'approche expérimentale.

2 – Analyse de l'activité antimicrobienne de la sécrétoneurine et du peptide AMENM

Nous avons cherché à déterminer si les peptides déjà connus naturellement produits par la SgII -la sécrétoneurine et le peptide AMENM- avaient une activité antimicrobienne.

Nous avons testé l'activité antimicrobienne deS peptides synthétiques sécrétoneurine et AMENM sur une souche de bactéries Gram+ (*Micrococcus luteus*) et de champignons filamenteux (*Neurospora crassa*). Même à des concentrations élevées (jusqu'à 100 μ M), ces peptides n'ont pas présenté d'activité.

3 – Analyse de la séquence de la SgII bovine

La SgII est une protéine très bien conservée dans le règne animal (Figure 56), ce qui signifie que sa fonction (encore non déterminée) est importante chez la plupart des organismes. La SgII, comme les autres chromogranines, est une protéine précurseur de peptides actifs, ce qui est confirmé par la production des peptides sécrétoneurine et AMEMN. Parce qu'elle est très fortement conservée tout au long de l'évolution, les informations fonctionnelles découvertes pour la SgII d'une espèce pourront s'appliquer aux formes conservées de la protéine d'une autre espèce. A l'heure actuelle, quatorze séquences de SgII de différentes espèces ont été rapportées.

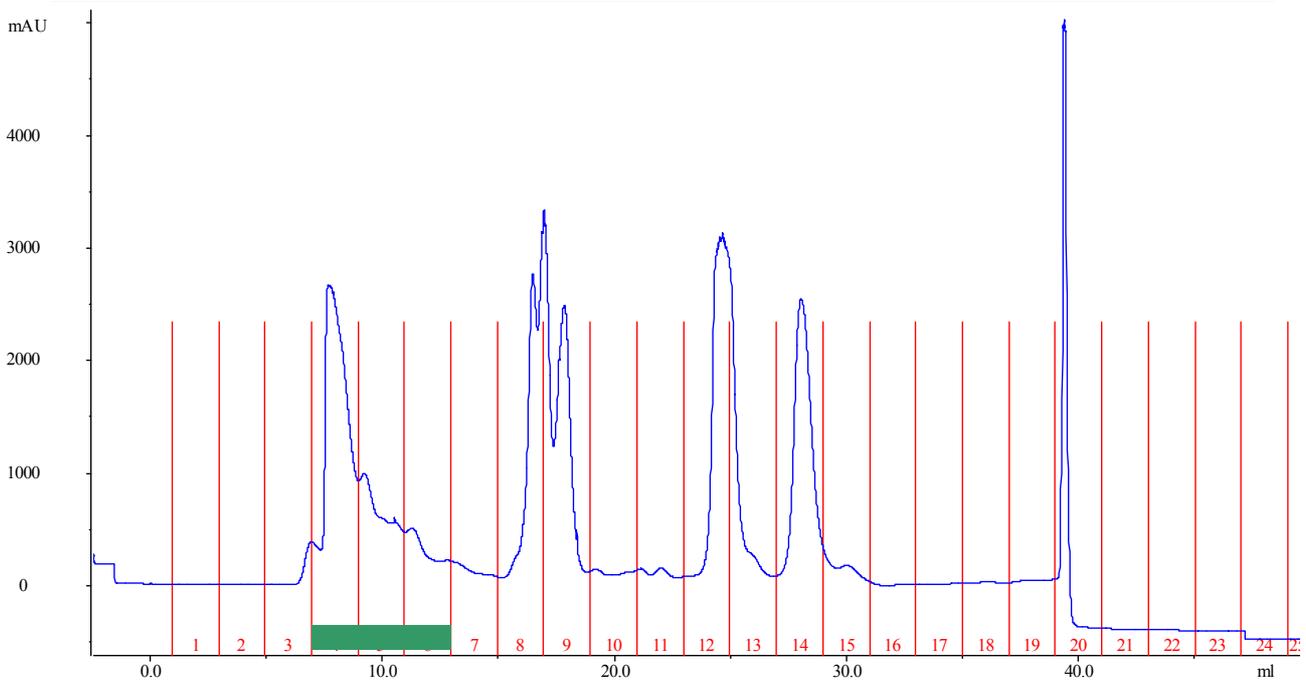


Figure 54 : Séparation par chromatographie d'exclusion Sephadex G75.
 Tampon phosphate pH 7,2. Les fractions contenant la SgII sont notées en vert

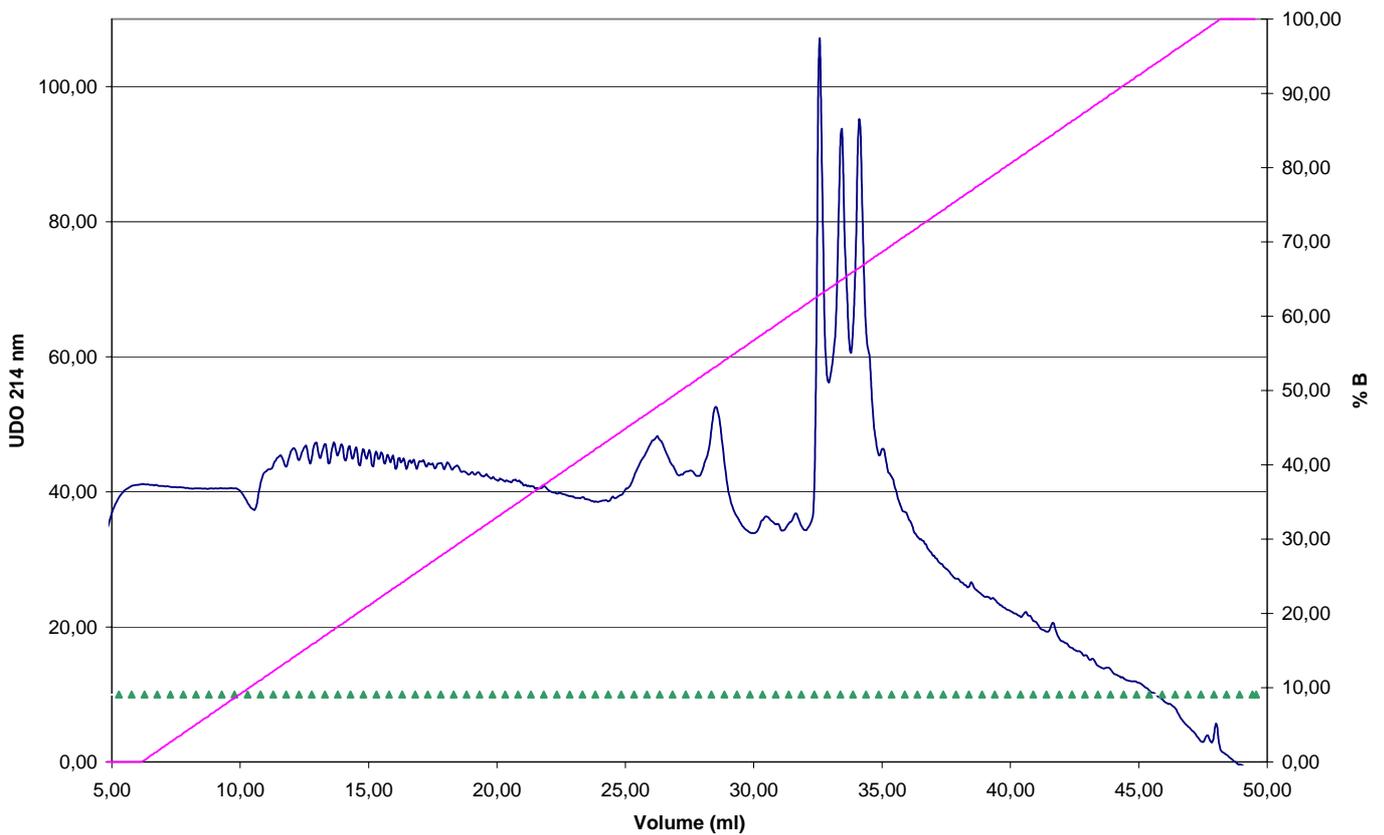


Figure 55 : Séparation HPLC des fractions obtenues par chromatographie d'exclusion
 La courbe rose représente le gradient de séparation utilisé, le tampon B étant composé de 70% d'acétonitrile, 0.1% TFA. Les triangles verts représentent les fractions collectées

Les informations fournies par l'alignement de séquence de la Figure 56, nous permettent de créer un arbre phylogénétique reliant les différentes espèces et, ainsi, de visualiser la conservation de la protéine au cours de l'évolution (Figure 57).

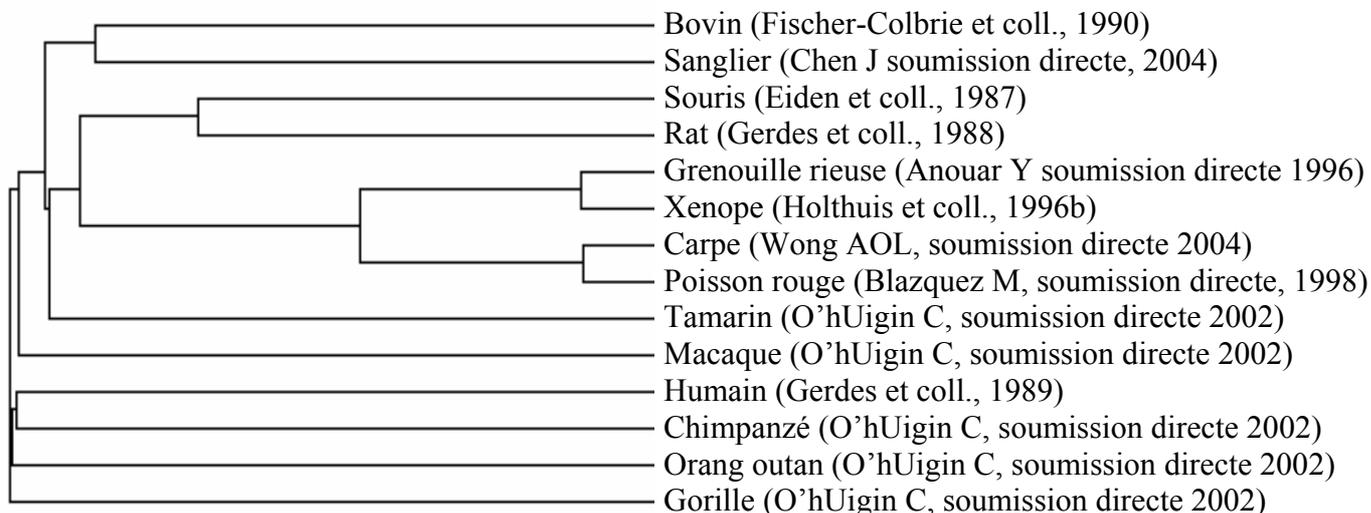


Figure 57 : Arbre phylogénétique des formes connues de la sécrétogranine II

Utilisation du logiciel ClustalW - <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>

Il est possible d'approfondir les informations fournies par la Figure 57 par des données récapitulatives permettant de déterminer un degré d'homologie entre les séquences de la SgII connues pour différentes espèces. Il existe un pourcentage d'homologie de séquence élevé entre les formes les plus étudiées de la SgII, c'est-à-dire, humaines, rats, souris et bovines (Tableau XVIII). Nous avons concentré notre étude sur la SgII bovine, mais il existe une homologie de 86,9 % entre les séquences de la SgII bovine et humaine. Pour cette raison, nous pouvons émettre l'hypothèse que les résultats trouvés pour ces nouveaux peptides actifs issus de l'analyse de la séquence de la SgII bovine pourront être étendus par analogie aux peptides de la SgII humaine.

Une lecture plus approfondie de la séquence de la SgII permet de mettre en lumière la présence de régions riches en résidus basiques et hydrophobes. Ces régions sont connues pour pouvoir générer des peptides à activité antimicrobienne (Bulet et coll., 2004). Cette analyse nous a amené à sélectionner quatre régions conservées de la SgII potentiellement antimicrobiennes (Tableau XIX). Les quatre nouveaux peptides correspondant à la SgII bovine ont été synthétisés dans notre équipe (Figure 56 et Figure 58).

Tableau XVIII : Tableau récapitulatif du pourcentage d'homologie entre les différentes séquences protéiques connues de la SgII

SIM - Alignment Tool for protein sequences sur expasy.org

	Rat	Souris	Humain
Bovin	78,7%	78,8%	86,9%
Humain	80,6%	81,4%	
Souris	95%		

Tableau XIX : Pourcentage d'homologie entre les séquences humaines et bovines des peptides choisis

Peptides	A	B	C	D
% d'homologie	81,8%	78,9%	75,0%	100,0%

4- Activités antimicrobiennes des peptides synthétiques (A-D)

Nous avons testé l'activité antimicrobienne de ces peptides sur une grande variété de micro-organismes : bactéries (*Micrococcus luteus*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*), champignons filamenteux (*Neurospora crassa*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Aspergillus fumigatus*), levures (*Candida albicans*). Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau XX. Les peptides B et D n'ayant pas montré d'activité pour des concentrations inférieures à 100 μ M, nous avons cessé les expérimentations menées sur ces peptides. En revanche, les peptides A et C présentent une activité contre *Bacillus megaterium* à des concentrations de 15 et 30 μ M. Pour approfondir ces résultats encourageants, nous avons décidé de digérer ces peptides par l'endoprotéase Glu C (enzyme produite par *Staphylococcus aureus*). En effet, afin de renforcer l'aspect cationique des peptides A et C, nous avons cherché à supprimer les résidus d'acide glutamique restant pouvant être à l'origine d'une perte d'efficacité. Ces nouveaux peptides ont été nommés A_E et C_E. Nous les avons testés et ils se sont avérés être plus efficaces contre les micro-organismes choisis. Nous avons pu noter, d'ailleurs, une activité spécifique contre les bactéries à Gram⁺ pour le peptide A_E (SgII₁₃₁₋₁₃₈), et contre les bactéries à Gram⁺ et les champignons filamenteux pour le peptide C_E (SgII₄₃₀₋₄₄₃).

Tableau XX : Bilan des activités antimicrobiennes des peptides synthétiques entiers et coupés par l'endoprotéase Glu C
(CMI : Concentration Minimale Inhibitrice)

* CMI 30

CMI 100

		<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Bacillus megaterium</i>	<i>Neurospora crassa</i>
A : SgII₁₂₈₋₁₃₈	+4 4h	90 μ M	* 15 μ M	76 μ M
A_E : SgII₁₃₁₋₁₃₈	+5 3h	5 μM	15 μM	100 μ M
B : SgII₃₇₃₋₃₉₃	+4 0h	> 100 μ M	> 100 μ M	> 100 μ M
C : SgII₄₂₈₋₄₄₃	+4 4h	> 100 μ M	* 30 μ M	> 100 μ M
C_E : SgII₄₃₀₋₄₄₃	+4 4h	* 5.6 μ M	* 30 μ M	19 μM
D : SgII₅₇₀₋₅₈₆	+3 3h	> 100 μ M	> 100 μ M	> 100 μ M

Dans le but de déterminer si ces peptides peuvent provoquer des lyses cellulaires, nous avons cherché à savoir s'ils avaient une activité hémolytique sur des érythrocytes de souris. Nous n'avons pas observé d'effet hémolytique de ces peptides à des concentrations égales à 100 μ M (Figure 59).

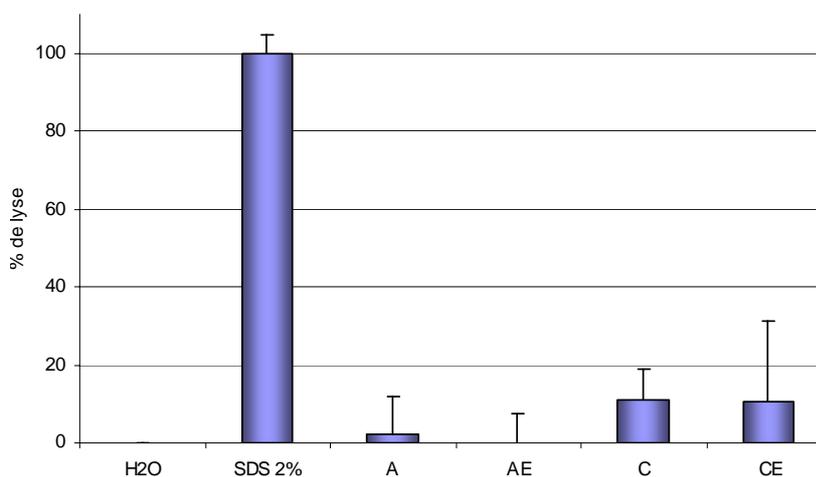


Figure 59 : Pourcentages de lyses d'érythrocytes de rat incubés avec 100 μ M de peptides à activité antimicrobienne (peptides A, C, AE et CE)

Ainsi, il semble que les peptides sélectionnés ne provoquent pas de lyse des hématies aux concentrations pour lesquelles une activité antimicrobienne est observée.

Cette étude des peptides antimicrobiens de la SgII s'est révélée fructueuse puisque nous avons pu mettre en avant l'existence de deux nouveaux peptides antimicrobiens issus des chromogranines ; ces peptides se remarquent par leur spécificité, A_E étant antibactérien et C_E surtout antifongique.

*5- Analyse de l'interaction des peptides A_E et C_E avec le champignon filamenteux *Neurospora crassa**

Nous avons utilisé la microscopie confocale pour analyser l'interaction entre les peptides A_E et C_E marqués à l'orange 548 et les membranes des champignons. Le peptide fluorescent CGB₆₀₂₋₆₂₆ marqué à l'orange 548, qui ne présente pas d'activité antifongique, a servi de contrôle (Lugardon et coll., 2001). L'orange 548 ne rentre pas dans les champignons aux concentrations expérimentales, et *Neurospora crassa* ne produit pas d'autofluorescence. Les spores de *N. crassa* ont tout d'abord été incubées pendant 21 h à 30°C, puis pendant cinq minutes avec 10 µM de peptide A_E ou 1 µM de peptide C_E (Figure 60). La présence de peptides fluorescents est observée au niveau de la paroi cellulaire et dans le compartiment intracellulaire. Il semble que la fluorescence entre dans les champignons par l'extrémité de leurs hyphes. La pénétration des peptides marqués semble très rapide, puisque cinq minutes d'incubation suffisent pour observer des champignons marqués. Cependant, la fluorescence est plus intense dans le cas du peptide C_E. En effet, ceci s'explique par le fait que le peptide C_E a un pouvoir antifongique plus élevé que le peptide A_E. Ainsi, les peptides A_E et C_E sont capables d'entrer dans les champignons tandis que le peptide CGB₆₀₂₋₆₂₆ reste à l'extérieur du champignon.

6- Recherche de similarité des peptides retenus avec des peptides antimicrobiens connus

Nous avons cherché à déterminer si la séquence de ces peptides était homologue de celle d'autres peptides antimicrobiens connus et caractérisés. C'est pourquoi nous avons cherché à aligner les séquences des peptides choisis avec les séquences de peptides antimicrobiens contenus dans une banque de donnée (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Ces peptides s'alignent avec des peptides antimicrobiens déjà connus et caractérisés (Figure 61). Ces données permettraient d'orienter nos connaissances pour la recherche du mode d'action de ces nouveaux peptides antimicrobiens.

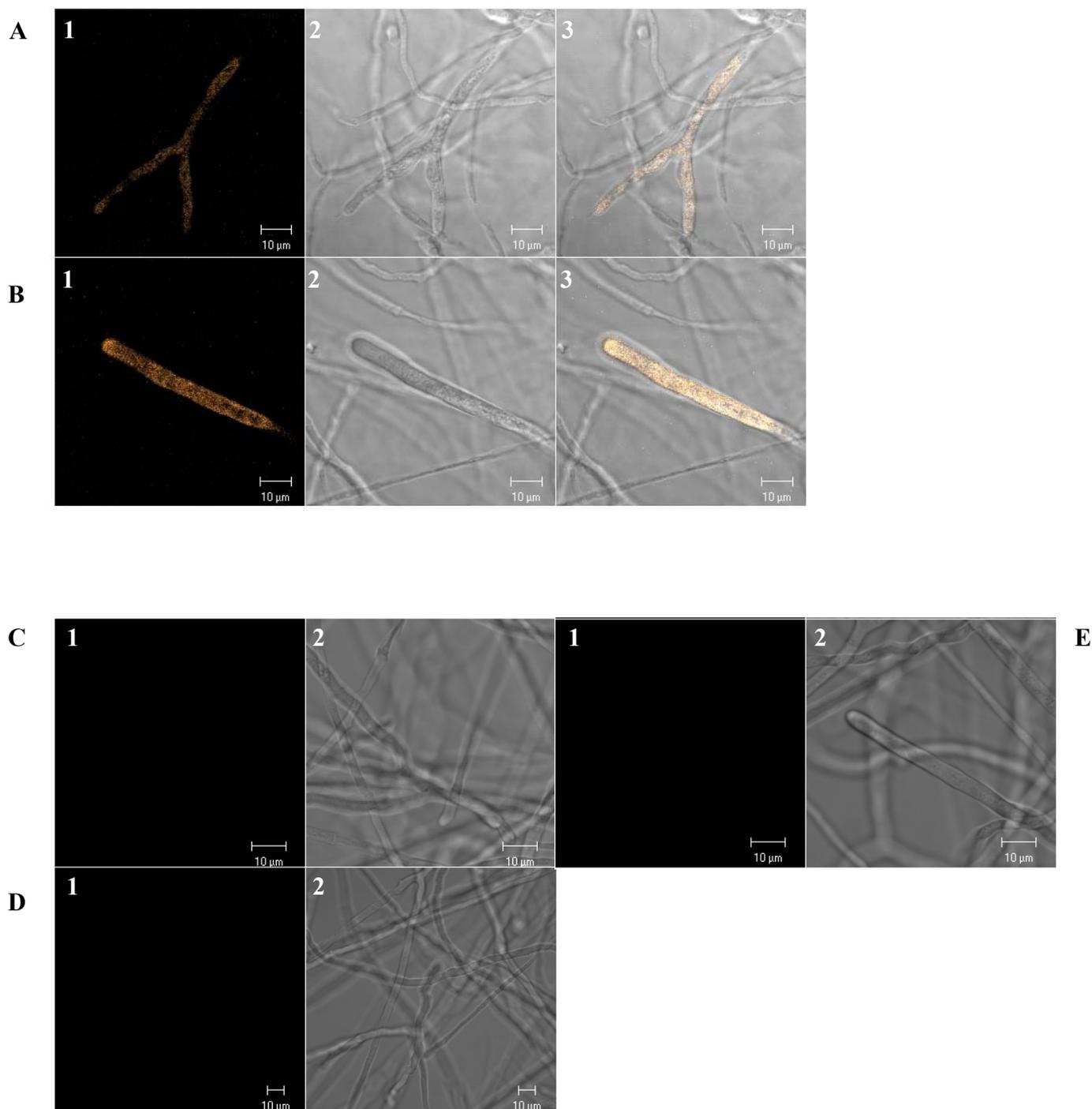


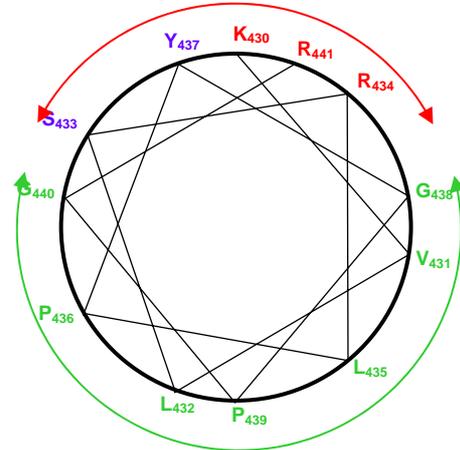
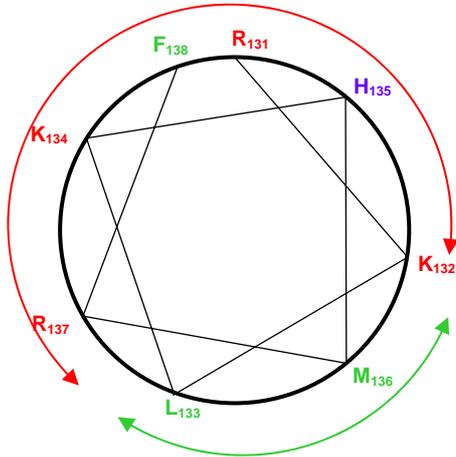
Figure 60 : Analyse de l'interaction des peptides synthétiques AE et CE marqués à l'orange 548 avec le champignon filamenteux *N. crassa*

1 : fluorescence, 2 : contraste de phase, 3 : superposition

(A) 10 μ M de peptide A_E incubé pendant 5 minutes avec *N. crassa* ; (B) 1 μ M de peptide C_E incubé pendant 5 minutes avec *N. crassa* ; (C) 100 μ M de peptide CGB₆₀₂₋₆₂₆ incubé pendant 5 minutes avec *N. crassa* ; (D) orange 548 incubé pendant 5 minutes avec *N. crassa* ; (E) *N. crassa* après 21h de croissance à 30°C

Bovin *RKLKHMRF*
 Sanglier *RKLEHMRF*
 Humain *RKLKHMQF*
 Souris *RKLKHMRF*
 Rat *RKLKHMRF*
 Tamarin *RKLKHMQF*
 Macaque *RKLKHMQF*
 Orang outan *RKLKHMQF*
 Gorille *RKLKHMQF*
 Chimpanzé *RKLKHMQF*

Bovin *KVLSRLPYGP GR SK*
 Sanglier *KILPRLPYGP GRAK*
 Humain *KVLPRLPYGA GRSR*
 Souris *KALMRLPYGP GKSR*
 Rat *KALLRLPYGP GKSR*
 Tamarin
 Macaque
 Orang outan
 Gorille
 Chimpanzé



SgII₁₃₁₋₁₃₈ : ₁₃₁RKLKHMRF₁₃₈
 . ++.+++.

SgII₄₃₀₋₄₄₃ : ₄₃₀KVLSRLPYGPGRSK₄₄₃
 .+...+ . . + +

Pourcentage d'identité : 33.33 %

Pourcentage d'identité : 33.33 %

Alignement : AKRHHGYKRFH

Alignement : TRSSRAGLQFPVGRVHLLRK

Séquence : RKLKH++MR+F+

Séquence : KVLSR++L++PYG+PGR++SK

Nom : P-113D.

Nom : Buforin II

Source : Humain

Source : Asian toad

Structure : Inconnue

Structure : Hélice (Méthode : RMN)

Activité : Gram+ et Gram-

Activité : Gram+ et Gram-, champignons

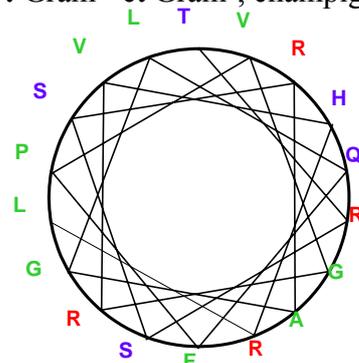
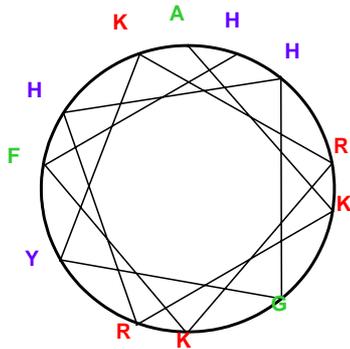


Figure 61 : Similarité de séquence entre les peptides synthétiques AE et CE dérivés de la secrétogranine II bovine et les différents peptides antimicrobiens connus

Utilisant le site de l'APS (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>). Alignement entre les séquences des peptides A et C (Bovin, sanglier, humain souris, rat, tamarin, macaque, orang outan, gorille, chimpanzé, les + indiquent les résidus cationiques, et les . les résidus hydrophobes). Présentation des séquences des peptides retenus sous forme d'hélice vue en projection (rouge : les résidus chargés ; vert : les résidus hydrophobes ; bleu : les résidus polaires ; la face chargée est représentée par la double flèche rouge et la face hydrophobe par la double flèche verte)

Par cette analyse, il est possible de mettre en avant le fait que le peptide A_E, qui s'est montré actif contre les bactéries à Gram⁺, comporte des similarités de séquence avec des peptides connus pour leur activité contre les bactéries. De même, le peptide C_E (qui est antifongique) s'aligne avec des peptides à activité antifongique. Ces données nous permettent de confirmer nos résultats. De plus, sur une projection en hélice des séquences des peptides retenus, les résidus chargés se répartissent majoritairement d'un côté de l'hélice, l'autre côté comprenant surtout des résidus hydrophobes, ce qui permet de mettre en avant la possibilité d'une structure en hélice amphipatique.

IV- Conclusion et perspectives

Cet axe de recherche visait à mettre en évidence l'existence de peptides à activités antimicrobiennes issus de la maturation de la SgII.

Notre première démarche expérimentale ne nous a pas permis de mettre en évidence la formation de peptides antimicrobiens naturels. En effet, la proportion de SgII naturelle, présente dans les granules de sécrétion des cellules chromaffines, est trop faible. Cependant, la recherche de séquences cationiques et amphipathiques s'est révélée plus fructueuse. En effet, cette étude nous a permis de mettre en évidence la possibilité qu'à la SgII de générer des peptides à activités antimicrobiennes et antifongiques.

La sécrétion d'une endoprotéase qui clive les liaisons peptidiques après les résidus d'acide glutamique à pH 4 ou 7,8 (l'endoprotéase Glu-C) est observable lors d'infections par *Staphylococcus aureus* (Drapeau, 1976). Cette enzyme, que nous avons utilisée afin de rendre plus actifs les peptides A et C, pourrait être à l'origine de leur formation endogène.

Les perspectives de ce travail sont nombreuses. Il serait très intéressant d'approfondir le mode d'action de ces peptides non toxiques pour les cellules de mammifères. Nous pourrions également chercher à déterminer si les isoformes humaines de ces peptides sont actives et tester ces peptides sur une batterie plus large de microorganismes, en particulier sur des pathogènes tels que *Staphylococcus aureus*. Nous pourrions rechercher ces peptides dans des fluides infectieux modèles, par exemple des lapins infectés par *Staphylococcus aureus* et poursuivre cette analyse par une étude de l'efficacité *in vivo* de ces peptides sur ces mêmes animaux modèles.

Enfin, nous pourrions rechercher ces peptides dans différents fluides biologiques, notamment dans le sérum de patients atteints de chocs septiques (le choc septique étant un état de stress physiologique intense), afin de déterminer si ces peptides sont naturellement produits

par l'organisme. En effet, des précurseurs de ces peptides pourraient être produits par l'organisme et ensuite subir une maturation sur le lieu de l'infection par l'action de l'endoprotéase Glu C.

Chapitre IV : Insertion d'un peptide antimicrobien dérivé de la chromogranine A dans une nanostructure

I- Contexte de l'étude

Cette étude fait l'objet d'une collaboration entre le groupe Neuropeptides Bioactifs de l'Inserm U575 et les Drs C. Egles et O. Etienne de l'Inserm U595.

La présence de CGA a été démontrée dans la salive (Kanno et coll., 1999), et nos travaux nous ont permis de confirmer sa présence dans la salive et le fluide gingival. Ainsi, chez des sujets sains, la quantité de PAMs dérivés des chromogranines pourrait être suffisante pour assurer une première ligne de défense contre les pathogènes.

Les matériaux prothétiques oraux font souvent l'objet d'une contamination de leur surface par des microorganismes fongiques. Parmi ceux-ci, *Candida albicans* est reconnu comme le principal agent pathogène responsable des candidoses orales (Kojic et coll., 2004). D'autres champignons et bactéries côtoient cette levure et sont aussi associés dans ces pathologies fongiques. En odontologie, la forme la plus répandue de candidose est la candidose sous-prothétique, encore appelée stomatite sous-prothétique (Iacopino et coll., 1992 et Dar-Odeh et coll., 2003).

Afin de conférer à la surface des matériaux prothétiques des propriétés antifongiques, nous nous sommes attachés à fonctionnaliser des films en multicouches de polyelectrolytes par un peptide antimicrobien à activité antifongique. Nous avons choisi la chromofungine, peptide constitué de 20 résidus dérivé de la vasostatine I, qui correspond à la région 47-66 de la CGA bovine (Lugardon et coll., 2001) (article figure 1).

II- Principaux résultats

1 – Publication 2

Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude ont donné lieu à une publication : *Antifungal coating by biofunctionalized polyelectrolyte multilayered films. Etienne O, Gasnier C, Taddei C, Voegel JC, Aunis D, Schaaf P, Metz-Boutigue MH, Bolcato-Bellemin AL, Egles C. Biomaterials. 2005 Nov;26(33):6704-12.* Les figures citées dans ce chapitre sont celles présentées dans la publication.

2- Stratégie expérimentale

a- Construction des films de polyélectrolytes

Deux protocoles de construction des films de polyélectrolytes ont été testés : le premier en alternant polyanions-peptides-polycations (trois temps de trempage), le deuxième après mélange préalable des peptides avec les polyanions, alternant ensuite (polyanions/peptides)-polycations (deux temps de trempage) (article figure 2). Dans les deux cas, les films ont montré la présence de la chromofungine rhodaminée, sans toutefois pouvoir quantifier la concentration finale dans le film.

b- Insertion de la chromofungine

La séquence de la chromofungine est très conservée au cours de l'évolution (article figure 1). Ce peptide, en plus d'être actif contre *Candida albicans*, possède des caractéristiques biophysiques qui le rendent fortement polarisé ce qui va faciliter son insertion dans les couches de polyélectrolytes (article figure 1). En effet, la chromofungine est un peptide cationique porteur, à pH neutre, de quatre charges positives, et contenant également neuf résidus hydrophobes.

Les travaux menés au sein de l'unité Inserm 595 ont tout d'abord confirmé la bonne insertion du peptide au sein du film, grâce à de la chromofungine rhodaminée synthétique, préparée à l'Inserm U575. Les observations en microscopie à fluorescence ont permis de constater l'homogénéité de la distribution des peptides dans le film, mais aussi sa cohésion au sein du film après avoir supprimé ponctuellement ce dernier par grattage (article figure 2).

c- Tests d'activité antifongique

Nous avons retenu la levure *C. albicans* (CMI : 10 μ M) et le champignon filamenteux *N. crassa* (CMI : 5 μ M) pour nos expériences. En effet, pour ces deux champignons, la forte activité antifongique de la chromofungine nous a permis d'envisager un résultat sans toutefois connaître précisément la concentration de peptide disponible dans le film. De plus, nous avons testé cet effet sur des films de 24 bicouches PEI-(PSS-PAH)₂-(PGA-Chf-PLL)₂₄ car l'effet additif des couches avait déjà été démontré (Etienne et coll., 2004).

La pénétration de la chromofungine dans la membrane des champignons constitue l'étape initiale du processus antifongique. Nous l'avons observée *in vitro* pour *C. albicans* comme pour *N. crassa* (article figure 3). Toutefois, les essais antifongiques par microtitration n'ont permis de montrer une différence de croissance que de l'ordre de 35 % (article figure 4). Deux explications peuvent être avancées pour expliquer ce résultat relatif. D'une part, la

concentration de peptide au sein du film était peut être insuffisante et d'autre part, lors de nos travaux sur l'incorporation de la chromofungine dans la membrane, nous avons observé que toutes les cellules ne présentaient pas cette incorporation.

d- Microscopie confocale

Les travaux en microscopie confocale, montrent que le site de prédilection pour la pénétration de la chromofungine correspond au site de croissance de l'hyphe ou du filament (article figure 3). Il est probable que toutes les cellules ne soient pas au même stade de croissance et que le film se vide de ses composants peptidiques sur les cellules alors en phase de croissance filamenteuse. Il apparaît nécessaire de mieux gérer ce mécanisme antifongique afin d'augmenter l'effet protecteur du film. Pour cela, il serait nécessaire d'augmenter la concentration en peptides au sein du film, et de modifier la composition du film afin que les peptides diffusent plus lentement, ce qui permettrait de le rendre actif sur une plus longue période et ainsi d'atteindre tous les champignons.

e- Tests de cytotoxicité

Afin d'évaluer le risque de cytotoxicité de telles architectures, des cultures de fibroblastes sur supports recouverts de films fonctionnalisés et sur supports recouverts de films non-fonctionnalisés ont été comparées. Les fibroblastes gingivaux primaires ont été obtenus à partir d'explants issus de biopsies gingivales lors d'avulsions de troisièmes molaires, ayant été obtenus avec le consentement des patients. Après 6 jours de culture, le support fonctionnalisé n'a montré aucune cytotoxicité envers les cellules, au contraire le décompte des cellules vivantes semble démontrer une meilleure adaptation des cellules (article figure 5).

f- Etude in vivo

Enfin, une étude *in vivo* a été menée sur 8 rats Wistar, équipés des mêmes pastilles de polyméthacrylate de méthyl. Avant la mise en place des pastilles, une insémination de la muqueuse jugale par *C. albicans* exprimant la GFP a été réalisée. Chaque rat a été appareillé par deux pastilles, l'une vierge, l'autre recouverte d'un film fonctionnalisé ou non, sur la face endobuccale de chaque joue. Après 6 jours *in situ*, les pastilles ont été récupérées, les animaux sacrifiés afin d'observer la muqueuse sous-jacente. Ces observations démontrent que les pastilles fonctionnalisées sont presque exemptes de contamination par les *C. albicans* et que la muqueuse sous-jacente est nettement moins infiltrée par la candidose. De plus, les surinfections autour des points de suture muqueux donnant lieu à une suppuration, sont

pratiquement inexistantes dans le cas des pastilles fonctionnalisées par la chromofungine (article figure 6). Il s'agit des premiers résultats obtenus *in vivo* sur les propriétés antifongiques de la chromofungine.

III- Conclusion et perspectives

Cette étude de la fonctionnalisation des films en multicouche de polyélectrolytes par la chromofungine est par conséquent très prometteuse. Des obstacles, tels que le dosage précis de la concentration en peptides du film, limitent encore la compréhension et la maîtrise totale du système. Cependant, l'application localisée d'un peptide antifongique sans résistance connue demeure une avancée intéressante dans la maîtrise de la protection du matériel prothétique oral, particulièrement chez les populations à fort risque telles les populations âgées, diabétiques, irradiés ou immunodéprimées. Un tel film peut également être envisagé pour la protection du matériel chirurgical et des cathéters.

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Antifungal coating by biofunctionalized polyelectrolyte multilayered films

Olivier Etienne, **Claire Gasnier**, Corinne Taddei, Jean-Claude Voegel, Dominique Aunis, Pierre Schaaf, Marie-Hélène Metz-Boutigue, Anne-Laure Bolcato-Bellemin and Christophe Egles

Biomaterials, 2005, Volume 26, N° 33, Pages 6704-6712

Pages 6704 à 6712 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.068>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Conclusion et perspectives

Depuis une dizaine d'années notre équipe est impliquée dans l'analyse de la maturation et des modifications post-traductionnelles des chromogranines. En 1993, les points de clivage de la CGA bovine ont été caractérisés (Metz-Boutigue et coll., 1993), puis, en 1997 ce sont les modifications post-traductionnelles de cette protéine qui ont été découvertes (Strub et coll., 1997).

Au cours de ces années, l'équipe a acquis l'expertise et le matériel nécessaire pour l'analyse protéomique. Ainsi, en 1995, les points de clivage de la CGB ont été caractérisés (Strub et coll., 1995), mais cette protéine étant moins abondante que la CGA dans les granules chromaffines bovines, il aura fallu plusieurs années de recherche pour pouvoir en caractériser les modifications post-traductionnelles en 2003.

Les modifications post-traductionnelles sont le reflet d'un état physiologique, d'un type cellulaire ou d'une pathologie, il est donc intéressant de les connaître afin de comprendre comment l'activité des protéines est modifiée en fonction de la pathologie et quels peuvent être les peptides dérivés sécrétés, entre autre dans les états de stress. La localisation des modifications post-traductionnelles joue un rôle important dans le patron de maturation protéolytique de ces prohormones et donc modifie le nombre et la nature des peptides générés, en particulier des peptides antimicrobiens.

Nous avons ensuite cherché à appliquer les mêmes techniques d'analyse protéomique à la SgII, protéine représentant 2 % des protéines totales des granules de sécrétion des cellules chromaffines bovines. Cependant, ce travail nécessite de nombreuses expériences et devra être poursuivi pour proposer le modèle de la structure primaire complète de la SgII. Cette protéine, de même que la CGA et la CGB, appartient à une classe de protéines sécrétées présentes dans les LDCVs des neurones et des cellules endocrines. Il est intéressant de mieux connaître la maturation protéolytique et les peptides dérivés de la SgII. En effet, ils peuvent être sécrétés dans les états de stress et participer (à l'image de la SN) à la régulation de l'inflammation. De plus, les peptides antimicrobiens dérivés de la SgII, que j'ai caractérisés dans mes expériences, argumentent l'idée d'un rôle de cette protéine dans la régulation de l'immunité, innée et adaptative.

Lors de mes expériences sur la SgII, je me suis heurtée à un problème : il semble que la faible quantité de SgII détectée soit en partie due au fait que la SgII pourrait se lier à d'autres protéines et en particulier à la CGA. En effet, en cherchant à purifier la SgII par

l'intermédiaire d'une chromatographie d'affinité, j'ai pu mettre en évidence des fragments de CGA, qui m'ont permis de caractériser de nouvelles modifications post-traductionnelles de cette protéine qui seront publiés prochainement (5 sites de phosphorylation : Ser₂₉₅, Ser₃₂₅, Ser₃₃₅, Thr₃₄₅ et Ser₄₁₆). En parallèle, une expérience de Western blot réalisée avec un anticorps dirigé contre la CGA de sérum humain, a mis en avant des fragments de SgII. Le lien entre ces deux protéines nous interpelle. En effet, la CGA est déjà connue comme étant capable de se lier à une autre chromogranine : la SgIII (Hosaka et coll., 2004). De plus, la CGA, avec la CGB pourraient jouer un rôle de chaperonnes permettant la sécrétion de la protéine SOD-1 mutante (responsable de la Sclérose Latérale Amyotrophique), cette sécrétion serait responsable de l'inflammation et de la mort neuronale. Ces nouvelles données concernant les fonctions probables des chromogranines ouvrent de nouvelles voies de recherche, afin de caractériser les interactions possibles de ces protéines, et de vérifier leur rôle potentiels de chaperonnes intra- et extracellulaires. Ainsi, il semblerait qu'une partie des difficultés techniques rencontrées lors de l'analyse de la SgII puisse être liée à ses rôles biologiques. Cette protéine semblent être capable de se lier à d'autres protéines, dans un rôle qui reste à découvrir.

La faible quantité de cette protéine est le premier facteur limitant son analyse. Les techniques dont nous disposons n'ont pas la sensibilité suffisante pour permettre la détection de cette protéine et de ses fragments, dont le signal est trop proche du bruit de fond. Afin de contourner ce problème de quantité, il faudra revoir les techniques utilisées pour ces analyses. En premier lieu, il me semble que les techniques d'électrophorèse bidimensionnelle classique ont atteint leurs limites pour cette étude, ainsi la séparation de la SgII pourra se faire grâce à de la nanoLC mono ou bidimensionnelle. La détection qui suivra pourra être réalisée grâce à des techniques sensibles de spectrométrie de masse telles que le Q-TOF. Pour aller plus loin, il me semble que les techniques émergentes de miniaturisation, et les techniques micro-fluidiques puissent permettre de grandes avancées dans la caractérisation des protéines minoritaires. Je pense en particulier aux nouvelles techniques de *lab-on-chip* qui sont des micro-plateformes dédiées aux études protéomiques, et dont l'avantage de la miniaturisation permet de gagner en sensibilité, de diminuer les contaminations en limitant les étapes de manipulation, de diminuer les pertes de matériel, et de gagner en temps d'analyse, ce qui évite les dénaturations des protéines.

Cependant, au-delà de ce changement de technologie, je pense qu'un changement de modèle cellulaire s'impose pour pouvoir établir les modifications post-traductionnelles de la SgII. Cette protéine est très peu exprimée dans les granules de sécrétion des cellules

chromaffines, c'est pourquoi il sera nécessaire de chercher à caractériser cette protéine dans des modèles dans lesquels elle est plus abondante. Le premier de ces modèles envisagés est la lignée de phéochromocytomes de rat : PC12 (Dittié et coll., 1995). Ce modèle a l'avantage de permettre la surexpression de la protéine par vectorisation. Cependant ces cellules étant d'origine cancéreuse les résultats obtenus ne seront le reflet que d'un état pathologique particulier et seront donc difficiles à généraliser. Le second modèle d'étude pourra être l'hypophyse, glande du cerveau dans laquelle la SN est retrouvée fortement exprimée (et en particulier l'hypophyse antérieure) (Kirchmair et coll., 1993). Ce changement de modèle, couplé à l'utilisation de techniques plus sensibles permettra d'obtenir les résultats attendus.

Les nouveaux peptides antimicrobiens dérivés de la SgII, que j'ai découverts au cours de ma thèse, sont un premier pas vers la compréhension des fonctions possibles de cette protéine. La SN (le peptide dérivé de la SgII le plus étudié) joue un rôle dans l'inflammation et dans l'immunité. Ainsi, ces nouveaux peptides antimicrobiens, pouvant être produits lors d'infections, confirment l'implication de la SgII dans les mécanismes liés à l'immunité. De plus, il est possible que ces peptides, à l'instar des défensines, puissent également avoir une action antimicrobienne indirecte, en agissant comme modulateurs du système immunitaire. Notre analyse structurale de la SgII nous a laissé supposer que cette protéine est précurseur d'autres peptides encore non caractérisés, laissant la voie ouverte à un nouvel axe de recherche : la caractérisation de ces peptides, et leur possible rôle dans la régulation de l'immunité.

Enfin, la découverte de nouveaux peptides antimicrobiens rajoute au panel d'outils disponibles et toujours nécessaires dans la lutte quotidienne contre les infections. Cette lutte prend toute son importance au niveau médical et la possibilité que nous avons présentée de pouvoir insérer des peptides antimicrobiens dans des films de polyélectrolytes élargit le champ d'application de ces peptides. L'intérêt se retrouve essentiellement au niveau des applications thérapeutiques, en effet, l'insertion de peptides actifs sur du matériel médical pourrait réduire les infections nosocomiales. Au-delà, il y a également des applications industrielles, en particulier agro-alimentaires, pour lesquelles l'insertion de peptides antimicrobiens pourrait permettre de limiter le développement des microorganismes et ainsi augmenter le temps de conservation des aliments. Ces applications sont déjà utilisées de façon industrielle avec des antibiotiques classiques. Cependant, les PAMs présentent une faible toxicité sur les cellules de mammifères, ils auraient donc une certaine innocuité. De plus, l'utilisation de ces peptides permet de limiter les conséquences liées à l'émergence des résistances multiples des pathogènes.

Matériels et Méthodes

I- Préparation du matériel biologique

La cellule chromaffine, cellule sécrétrice de la médullo-surrénale de bœuf est notre modèle d'étude biologique. Au sein de ce modèle, les protéines étudiées sont les chromogranines / sécrétogranines

1 – Purification des protéines solubles de la matrice intragranulaire des cellules chromaffines

C'est à l'abattoir municipal de Haguenau, que sont prélevées les glandes surrénales de bœufs, juste après la mort de l'animal. Elles sont maintenues à 4°C durant le transport jusqu'au laboratoire pour un traitement immédiat.

La technique d'extraction du matériel intragranulaire des cellules chromaffines que nous utilisons est basée sur le principe du fractionnement sub-cellulaire sur gradient de sucrose. Nous avons utilisé le protocole modifié et adapté aux glandes surrénales par D. Aunis (Aunis et coll., 1977), basé sur le procédé d'extraction initialement décrit par A.D. Smith et H. Winkler (Smith et coll., 1967).

La préparation des protéines solubles se fait sur le matériel global extrait de 10 à 20 glandes. Toutes les opérations sont réalisées à 4°C afin de préserver l'intégrité des protéines. Les glandes surrénales de bœuf sont dégraissées, puis coupées en deux selon l'axe longitudinal pour en prélever ensuite le tissu médullaire. Celui-ci est finement haché manuellement, puis broyé de façon mécanique à l'aide d'un piston épousant exactement le profil interne du potter, dans du sucrose 0,32 M, 10 mM Hepes, pH 7. Les différents débris et fragments cellulaires sont éliminés dans le culot d'une centrifugation à basse vitesse (800 g, 20 min, 4°C).

Le surnageant après filtration est à nouveau centrifugé (12 000 g pendant 20 min à 4°C). Le surnageant de cette centrifugation est ensuite récupéré, homogénéisé par une *potterisation* manuelle.

Par une nouvelle centrifugation à 100 000 g sur gradient de sucrose (1,6 M sucrose, 10 mM Hepes, pH 7) pendant 90 min à 4°C, les granules sont finalement prélevés, pour ensuite être lysés par choc thermique (cycles répétitifs de congélation/décongélation). Une centrifugation finale à 100 000 g pendant 30 min à 4°C permet de récupérer ce dernier

surnageant qui contient le matériel intra-granulaire tandis que le culot renferme les membranes des granules.

II- Dosage protéique

Après la préparation du matériel intra-granulaire des cellules chromaffines, il est indispensable de connaître la quantité des protéines présentes.

La quantité de protéines est évaluée par dosage suivant la méthode de Bradford (Bradford, 1976). C'est une technique de mesure de concentration protéique basée sur une réaction colorimétrique entre les protéines et le Bleu Brillant G-250 dans de l'acide phosphorique et du méthanol (Bio-Rad). Ce réactif, brun-rouge à l'état libre, prend une teinte bleue quand il est lié aux protéines. Il possède un coefficient d'extinction molaire élevé dans le visible, ce qui permet un dosage protéique très sensible. Pour doser les extraits protéiques, nous réalisons une gamme étalon avec de l'albumine sérique de bœuf à 25 µg/ml en solution dans de l'eau milliQ, correspondant à une quantité croissante de protéines variant de 0 à 20 µg (soit de 0 à 800 µl). Le volume de chaque tube ainsi que celui de notre échantillon à tester est ajusté à 800 µl par addition d'eau milliQ. Tous les tubes sont alors traités par addition de 200 µl de réactif de Bradford. La courbe d'étalonnage obtenue en portant en abscisse la quantité de protéines (en µg) et en ordonnée l'absorbance à 595 nm correspondante, permet de déduire la quantité de protéines présente dans les échantillons testés par simple lecture de l'absorbance.

Le matériel intra-granulaire est ensuite aliquoté en fractions de 1 ml qui sont conservées à -20°C.

III- Synthèse peptidique

Tous les peptides synthétiques présentés dans cette thèse ont été préparés par G. Nullans (Ingénieur de Recherche CNRS ; Inserm U575) à l'aide d'un synthétiseur Applied Biosystems utilisant la technique de synthèse en phase solide Fmoc (9-fluorenylmethoxycarbonyl) dite technique de Merrifield (Merrifield, 1965).

Les peptides résultant de la synthèse sont ensuite purifiés par HPLC de phase inverse sur colonne semi-préparative Nucléosil RP 300-7C18 (granulométrie 7 µm, 10 mm x 250 mm). Après lyophilisation, la pureté des peptides synthétiques est de nouveau contrôlée par spectrométrie de masse MALDI-TOF.

Dans le cadre des analyses par microscopie confocale, il a été utile de marquer les peptides d'intérêt avec une molécule fluorescente. Les peptides synthétiques sont rendus fluorescents par addition de rhodamine (5(6)-carboxy-tétraméthylrhodamine (Fluka)) qui est fixée sur le groupement NH₂-terminal du peptide synthétique, par incorporation en fin de synthèse de la même manière qu'un acide aminé.

Nous avons également marqué des peptides par de l'orange 548. Pour cela 2 mg de peptides ont été dissout dans 1 ml de tampon bicarbonate (0,1 M, pH 9). 1 mg de molécule fluorescente est repris dans 400 µl de tampon bicarbonate. 50 µl de cette solution sont ajoutés à la solution peptidique. Le milieu réactionnel est laissé à incuber 1h à température ambiante, sous agitation douce (10 tours/min). Le peptide marqué est ensuite purifié sur colonne Sephadex G25, en utilisant comme phase mobile du tampon phosphate pH 7,2 22 mM.

IV- Méthodes de purification des échantillons biologiques

Lors de cette étude, nous avons concentré nos recherches sur l'analyse des chromogranines A, B et sécrétogranine II. Ces protéines acides et fortement modifiées doivent subir différentes étapes de purification avant de pouvoir être caractérisées, en particulier lorsqu'il s'agit de localiser leur modifications post-traductionnelles et de mettre en évidence leur peptides dérivés. C'est dans le cadre de ces études que nous avons joué sur différents types de chromatographie, permettant des séparations combinées selon plusieurs caractéristiques biochimiques. La chromatographie d'affinité permet de récupérer une protéine spécifique grâce à l'interaction avec un ligand greffé sur une résine. La chromatographie d'exclusion permet la séparation des protéines d'un mélange en fonction de leur taille, et la chromatographie de phase inverse en fonction de leur hydrophobicité.

1 – Préparation de l'échantillon

L'échantillon doit être entièrement soluble dans la phase mobile à toutes les concentrations utilisées. Si l'échantillon a une concentration en sels beaucoup trop forte, celle-ci peut être réduite par dialyse ou en procédant à une extraction acide du matériel protéique. Les purifications préliminaires doivent se faire de préférence avec des solutions volatiles qui sont éliminées lors de la concentration de l'échantillon à la Speed-Vac. Les échantillons sont concentrés jusqu'à un volume minimum de 20 µl.

2- Chromatographie HPLC de phase inverse

L'HPLC de phase inverse est une technique qui permet de séparer les constituants d'un mélange, en utilisant comme critère de séparation la différence d'hydrophobicité des constituants du mélange à analyser. L'HPLC utilise la pression produite par une pompe pour pousser la phase mobile à travers la phase stationnaire de la colonne. La phase stationnaire est constituée d'un support de silice greffée par des chaînes aliphatiques longues de 18 atomes de carbone (C₁₈). Plus le soluté est hydrophobe, plus il est retenu au niveau de la phase stationnaire par les interactions hydrophobes de ces chaînes carbonées.

a- Préparation de la phase mobile

La phase mobile est composée de deux solvants dont les proportions varient au cours de la séparation :

solvant A : acide trifluoroacétique (TFA) 0,1 % dans l'eau milliQ,

solvant B : TFA 0,1 % / Acétonitrile 70 % / eau milliQ 29,9 %.

Seuls des produits chimiques de la plus haute pureté doivent servir à la préparation de la phase mobile. Nous utilisons des solvants spécialement prévus pour cette application et fournis par Carlo Erba.

b- Séparation

Le système HPLC que nous utilisons est un *ÄKTA purifier*, il comporte un programmeur de gradient couplé à deux pompes à seringues, un détecteur à longueur d'onde variable et un injecteur de type rhéodyne. L'élution se fait à température ambiante sur une colonne de phase inverse Macherey Nagel C18 Nucleosil 300-5C18, 4 X 250 mm ; granulométrie 5 µm, porosité 300 nm. Le gradient est réalisé à partir du mélange des solvants A et B.

L'élution des peptides est réalisée à un débit de 0,7 ml/min suivant un gradient prédéfini. La détection des peptides se fait à 214 nm, longueur d'onde qui correspond au maximum d'absorption de la liaison peptidique. Le prélèvement des différentes fractions est obtenu à l'aide d'un collecteur automatisé dans des tubes Minisorp Nunc, traités pour minimiser la rétention du matériel protéique sur les parois.

3- Chromatographie d'exclusion

La colonne utilisée est une colonne Superdex™ 75 10/300 GL (Amersham) composée de billes sphériques d'agarose greffée avec du dextran. La colonne mesure 30 cm de haut sur 1 cm de diamètre et contient un volume de billes de 24 ml qui ont un diamètre de 13 µm. Le volume d'échantillon injecté est de 200 µl. L'éluion des peptides se fait dans du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) à un débit de 0,5 ml/min. Le volume collecté de chacune des fractions est de 2 ml. Cette colonne est installée sur le système Akta purifier (Amersham).

4- Chromatographie d'affinité

Nous utilisons la chromatographie d'affinité pour pouvoir récupérer plus spécifiquement et en quantité suffisante la protéine à analyser.

La phase stationnaire de cette chromatographie est un support macromoléculaire chimiquement inerte sur lequel est greffé un effecteur, qui présente une activité biologique (bio-affinité) pour un soluté de l'échantillon à analyser. Dans notre étude, il s'agit de l'interaction d'un antigène avec un anticorps.

Le principe de la chromatographie d'affinité repose sur la reconnaissance entre une molécule du mélange à séparer et une molécule greffée sur la résine, le ligand, ces deux molécules interagissant de manière hautement spécifique. Des anticorps spécifiques de la protéine à étudier sont fixés sur des colonnes HiTrap NHS (Amersham Bioscience).

Avant de réaliser la chromatographie d'affinité, il est nécessaire, dans un premier temps, de fixer les anticorps sur la colonne. Cependant, nous utilisons des anticorps polyclonaux dont le titre dans le sérum de lapin est bas. C'est pourquoi une étape préliminaire s'impose afin de concentrer et purifier les anticorps spécifiquement produits dans le sérum il est possible d'utiliser soit une colonne échangeuse d'ions, soit une colonne d'affinité utilisant l'antigène comme ligand.

a- Purification d'anticorps polyclonaux à partir de sérum de lapin

Nous avons utilisé un kit basé sur la précipitation des protéines du sérum grâce au CAP-8 (Caprylic Acid Precipitation) (Sterogenebioseparations). Un volume de CAP-8 est ajouté à deux volumes de sérum puis placé sous agitation modérée (10 tours/min) pendant 30 min. La solution est centrifugée à 1 200 g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant est prélevé et le culot est dissout dans l'eau, puis centrifugé à 1 200 g pendant 10 min à 4°C. Une fois filtrée sur filtres Millex™ 0,22 µm (Millipore), la solution obtenue par la réunion des deux

surnageants est chromatographiée sur colonne échangeuse d'ion SP Truput Plus, qui a été préalablement équilibrée par le passage de 30 ml d'acétate de sodium 0,5 M pH 5,8. Les protéines contaminantes sont éluées en premier par 20 mM d'acétate de sodium pH 5,8, les anticorps sont élués ensuite par une augmentation de la force ionique obtenue par à une solution de 300 mM NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH 8. La densité optique (DO) à 280 nm est suivie en continu afin de suivre l'éluion des anticorps pour pouvoir conserver une concentration maximale de ceux-ci. Les anticorps obtenus sont ensuite dessalés puis concentrés par évaporation à la Speed-Vac.

b- Fixation des anticorps sur la colonne d'affinité

Le ligand (anticorps) est dissout dans un tampon de couplage (0,5 M NaCl, 0,2 M NaHCO₃, pH 8,3) jusqu'à une concentration de 0,5-10 mg/ml dans un volume optimal de 1 ml. La colonne est lavée avec trois volumes d'HCl 1 mM froid. Puis la solution de couplage contenant le ligand est injectée sur la colonne et laissée à incuber 30 min à 25°C. La colonne est ensuite lavée et les fonctions non liées sont désactivées par trois volumes d'une solution 0,5 M NaCl, 0,5 M éthanolamine, pH8,3 en alternance avec des lavages de trois volumes d'une solution 0,5 M NaCl, 0,1 M acétate, pH4. Finalement, la colonne est neutralisée par ajout de tampon 0,05 M Na₂HPO₄, pH 7.

c- Purification de l'échantillon

La colonne est équilibrée par dix volumes de colonne de tampon 75 mM Tris-HCl pH 8 (A). Puis 1 ml d'échantillon dissout dans le tampon A est déposé sur la colonne. Les protéines non fixées de l'échantillon sont éluées par dix volumes de colonne de tampon A. La protéine d'intérêt est éluée par trois volumes de tampon 0,5 M NaCl, 100 mM Glycine-HCl pH 2,7 et l'éluat est neutralisé dans le tube par ajout de 100 µl de 1 M Tris-HCl pH 8,5. La colonne est ensuite lavée et rééquilibrée par dix volumes de tampon A. L'échantillon peut être dessalé avant analyse.

5- Dessalage des échantillons

Avant l'électrophorèse bidimensionnelle, il est indispensable d'éliminer les sels de l'échantillon à analyser, car ceux-ci peuvent générer de l'électro-endosmose lors de l'isoélectrofocalisation. Cette étape de dessalage peut être effectuée grâce au kit de dessalage *ready-Prep 2D Cleanup Kit* (Bio-Rad) basé sur le principe de la précipitation des protéines.

Mais, une autre méthode de dessalage possible est la dialyse. Elle est réalisée en utilisant des sacs à dialyse (SpectraPore) ou des tubes contenant une membrane de dialyse

(lorsque les volumes à dialyser sont plus faibles) (Amersham Biosciences) permettant la rétention des molécules ayant une masse moléculaire supérieure à 1000 Da. La dialyse est réalisée à 4°C, et le milieu de dialyse (eau) est changé toutes les heures pendant 4 h.

La chromatographie HPLC (RP sur colonne C₁₈) peut également être utilisée comme technique de dessalage par l'utilisation d'un gradient spécifique rapide (lavage pendant 20 min par 0 % de tampon B, puis élution rapide par augmentation brusque du gradient de 0 % de B à 100 % de B en 5 min).

V- Analyse des protéines par gels d'électrophorèse

Les protocoles nécessaires à la mise en place d'une approche protéomique diffèrent selon le type d'échantillon étudié et nécessitent de nombreuses mises au point. Bien que différents protocoles soient disponibles dans la littérature, ils doivent toujours être adaptés selon le type d'échantillon pour une optimisation des résultats. Les produits chimiques et appareils décrits dans cette partie proviennent pour la plupart de Bio-Rad (Hercules, CA).

1 – Electrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide

L'analyse qualitative d'un mélange de protéines peut être obtenue par électrophorèse monodimensionnelle SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) après dénaturation et réduction-alkylation. Les protéines sont séparées en fonction de leur masse moléculaire apparente (Laemmli, 1970).

La séparation des différentes protéines du mélange est effectuée dans un système de type Mini-Protean 3. Avant dépôt sur le gel, les protéines de l'échantillon sont dénaturées. Les échantillons (concentrés jusqu'à un volume de 15 µl par séchage à la Speed-Vac) sont dilués dans du tampon de dénaturation (20 mM 2-β-mercaptoéthanol, 3 % SDS (m/v), 10 % glycérol (v/v), 0,01 % bleu de bromophénol (m/v), 10 mM Tris-HCl pH 6,8) selon le rapport trois volumes d'échantillon pour un volume de tampon, puis portés à ébullition pendant 3 min. Pour chaque expérience, 20 µg de PSG (Protéines Solubles des Granules chromaffines de la médullosurrénale bovine) sont déposées comme contrôle sur le gel afin de s'assurer du bon déroulement de l'électrophorèse et de l'immunodétection. Par ailleurs, les poids moléculaires (PM) visualisés par des bandes colorées, correspondant à des protéines standard (Invitrogen, Sigma ou Bio-Rad) de poids moléculaire compris dans la gamme d'utilisation sont déposés systématiquement dans un puit. Les échantillons protéiques à analyser sont

déposés sur un gel de concentration de 4 % en polyacrylamide, puis séparés dans un gel de séparation de concentration d'acrylamide variant jusqu'à 12 % ou 17 % selon les expérimentations, et selon la taille des protéines à séparer.

La migration électrophorétique est réalisée en deux étapes : tout d'abord le dispositif est soumis à un champ électrique de 50 V pendant 30 min, puis à un champ électrique de 100 V jusqu'à ce que le bleu de bromophénol, présent dans le tampon de charge, sorte du gel. Lors de la migration, le gel d'électrophorèse est en contact avec un tampon de migration identique à l'anode et à la cathode, et constitué de 192 mM glycine, 0,1 % SDS, 25 mM TrisHCl pH 8,2. (Towbin et coll., 1979).

2- Electrophorèse bidimensionnelle

Elle consiste à combiner successivement deux principes différents de séparation. La première séparation est obtenue suivant une trace linéaire, puis suivie d'une seconde séparation dans une direction orthogonale à la précédente, d'où le nom d'électrophorèse bidimensionnelle (ou 2D) donné à cette technique. La plus utilisée de ces techniques est celle qui consiste à effectuer dans la première dimension une isoélectrofocalisation (IEF) (séparation des protéines d'un échantillon complexe selon leur point isoélectrique (pI)) et dans l'autre dimension une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) pour séparer les protéines selon leur masse moléculaire relative M_r .

Introduite au début des années 70, cette technique ne prend son essor qu'après la démonstration de O'Farrell en 1975 (O'Farrell, 1975) de la séparation d'un extrait bactérien de plus d'un millier de molécules sur un seul gel d'environ 20 × 20 cm.

a- Isoélectrofocalisation

Nous avons choisi de travailler sur des bandelettes de gel précoulé à gradient de pH immobilisé (IPG pour Immobilized pH Gradient), développées par Bjellqvist et coll. (Bjellqvist et coll., 1982). Elles permettent d'obtenir des expériences très reproductibles et d'éviter les phénomènes de dérive cathodique observables avec les capillaires précédemment utilisés.

L'isoélectrofocalisation permet de séparer les protéines selon leur point isoélectrique (pI), pH auquel la charge électrique globale de la protéine est nulle. L'application d'un champ électrique permet aux protéines de migrer, dans un support solide, jusqu'à atteindre leur pI et de s'y arrêter. Cette méthode permet de séparer de nombreuses protéines différentes et de

discriminer des molécules qui auraient subi une mutation ou une modification post-traductionnelle changeant ainsi leur charge électrique.

La première dimension est réalisée en utilisant l'IPGphor™ (Isoelectric Focusing System, Amersham Pharmacia Biotech) ou le Protean IEF cell (Bio-Rad). Nous avons utilisé des bandelettes IPG (IPGStrips ou ReadyStrip IPG strip) de 7 cm, 11 cm ou 24 cm, couvrant trois gammes de pH (3-10, 4-7, 4,5-5,5). Plus la bandelette est longue et la gamme de pH étroite, plus la résolution de la séparation est grande.

✓ *Réhydratation*

De 100 µg de protéines (pour les bandelettes IPG 7 cm) à 1 mg (pour les bandelettes 17 cm) sont repris dans un volume de 125 µl, 200 µl ou 500 µl de tampon contenant 8 M d'urée, 4 % CHAPS (w/v), 100 mM DTT, 0,2 % (v/v) d'ampholytes pH 3-10 ou pH 4-7 (Tableau XXI). Ce mélange est déposé au centre d'une rigole du plateau de focalisation et une fine bandelette IPG est délicatement déposée dessus. L'ensemble est protégé de la déshydratation et de l'oxydation par environ 2 ml d'huile minérale. La réhydratation s'effectue en appliquant un courant de 50 V, pendant un minimum de 12 h à 20°C.

✓ *Migration*

Le programme de focalisation nécessite trois étapes à 20°C (Tableau XXII), dont le voltage diffère selon l'utilisation d'une bandelette de 7, 11 ou 24 cm :

- une phase de conditionnement (15 min à 250 V), permettant d'éliminer l'excès de sels,
- une montée linéaire en voltage (de 250 à 4000 V en 2 h pour une bandelette 7 cm, de 250 à 8 000 V en 2 h 30 pour une bandelette 11 cm, de 250 à 10 000 V en 3 h pour une bandelette 24 cm).
- une phase de focalisation (5 h à 4 000 V pour une bandelette 7 cm, 6 h à 8 000 V pour une bandelette 11 cm, ou 10 h à 10 000 V pour une bandelette de 24 cm).

Enfin une étape à 500 V est appliquée jusqu'à l'arrêt du programme afin d'éviter la diffusion des protéines au sein du gel.

Les bandelettes peuvent être directement utilisées pour la deuxième dimension ou stockées à -80°C.

Tableau XXI : Volumes de tampon d'équilibration en fonction de la taille des bandelettes de gel.

	7 cm	11 cm	24 cm
Volume de réhydratation	125 µl	200 µl	450 µl
Tampon d'équilibration I	2.5ml	4ml	8ml
Tampon d'équilibration II	2.5ml	4ml	8ml

Tableau XXII : Conditions de réhydratation.

	7 cm 50 µA/strip	11 cm 50 µA/strip	24 cm 50 µA/strip
Réhydratation	50 V 12 h	50 V 12 h	50 V 12 h
Conditionnement	250 V 15 min	250 V 15 min	250 V 15 min
Montée linéaire	4 000 V ↗ 2 h	8 000 V ↗ 2 h 30	10 000 V ↗ 3 h
Focalisation	4 000 V 20 000 Vh	8 000 V 48 000 Vh	10 000 V 100 000 Vh

↗ = augmentation linéaire de voltage

b- Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

Les bandelettes IPG sont mises en présence de dodécylsulfate de sodium (SDS) qui se lie aux protéines en leur conférant une charge négative importante, masquant complètement les charges propres de la protéine. Cette propriété permet, sous l'action d'un courant, la migration des protéines de l'échantillon vers l'anode. Le gel d'acrylamide permet un tamisage moléculaire (les grosses molécules migrent plus lentement que les petites) et les protéines se répartissent le long du trajet de migration en fonction de leur masse moléculaire.

✓ Réduction alkylation des molécules

Les bandelettes sont équilibrées dans 10 ml de tampon d'équilibration (2 % (w/v) SDS, 6 M d'urée, 20 % glycérol (v/v), 130 mM DTT, 375 mM Tris-HCl pH 8,8) durant 10 min. Cette étape permet de saturer le gel en SDS et de réduire les protéines sous l'effet du DTT. Les bandelettes sont ensuite placées 10 min dans le même tampon en substituant le

DTT par 250 mM d'iodoacétamide (Sigma), permettant l'alkylation des résidus cystéine. 70 µl de bleu de bromophénol 0,005 % sont ajoutés à la solution d'alkylation afin de colorer la bandelette et suivre la migration des protéines.

✓ *Migration*

La bandelette équilibrée est placée sur un gel composé de 12 % acrylamide (sans gel de concentration) puis fixée dans une solution contenant 1 % d'agarose à bas point de fusion 0,1 % bleu de bromophenol diluée dans du tampon de migration. Les bandelettes 7 cm sont déposées sur un gel de petite dimension (8 x 8 cm), les bandelettes de 11 cm sur un gel de grande dimension (20 x 20 cm), et enfin les bandelettes 24 cm sur des gels de très grande dimension (28 x 28 cm). 10 µl de marqueur de masse moléculaire sont déposés sur un côté du gel pour permettre la caractérisation des masses moléculaires.

La migration des protéines est réalisée dans un tampon composé de 192 mM de glycine, 0,1 % de SDS, 25 mM Tris –HCl pH 8.2.

Pour les petits gels, une tension de 50 V est appliquée pendant 30 min, puis 100 V jusqu'à la fin de la migration. Pour les gels de taille moyenne, une tension de 50 V est appliquée pendant 30 min, puis 150 V jusqu'à la fin de la migration. Pour les grand gels, un ampérage de 32 mA est appliqué pendant 1 h puis 48 mA jusqu'à la fin de la migration.

3- Coloration des protéines au bleu de Coomassie

Après la migration des protéines dans le gel d'acrylamide, celles-ci peuvent être colorées au bleu de Coomassie R-250 (Sigma). Le gel est incubé dans une solution 0,1 % (w/v) bleu de Coomassie R-250, 50 % (v/v) méthanol, 10 % (v/v) acide acétique pendant 1 h sous agitation. Puis le gel est décoloré par plusieurs bains successifs dans une solution 40 % (v/v) méthanol, 10 % (v/v) acide acétique pendant une période variant de 4h à une nuit sous agitation. Les protéines restent colorées et seront visibles, permettant d'obtenir ainsi une information quant à leur poids moléculaire, grâce à l'utilisation de protéines standards de référence.

4- Coloration des protéines au nitrate d'argent

La coloration des protéines au nitrate d'argent est une technique 10 fois plus sensible que la coloration au bleu de Coomassie. Cependant, l'utilisation du nitrate d'argent est délicate, c'est pourquoi des kits ont été mis au point afin de simplifier la technique et

d'augmenter la reproductibilité. Nous avons utilisé le kit Dodeca Silver Stain Kit de chez Bio-Rad.

Les gels sont tout d'abord fixés sous agitation pendant 30 min ou toute la nuit dans une solution 40 % (v/v) d'éthanol, 10 % (v/v) d'acide acétique. Puis le gel est sensibilisé dans 10 % (v/v) de *Sensitizer concentrate*, 1 % (v/v) de *Background reducer concentrate*, 30 % (v/v) d'éthanol, pendant 30 min sous agitation. Après 3 lavages successifs de 5 min chacun et sous agitation dans l'eau déminéralisée, le gel est coloré pendant 20 min sous faible agitation également dans un tampon 2 % (v/v) *Silver reagent concentrate*. Le développement du gel se fait après deux brefs rinçages du gel (deux lavages d'une minute dans l'eau) dans un tampon spécifique : 10 % (v/v) *Development buffer concentrate*, 0,02 % (v/v) *Image developer concentrate*, 0,005 % (v/v) *Background reducer concentrate*. Le développement se fait sous agitation, le temps nécessaire pour obtenir la coloration désirée (entre 5 à 30 min). La coloration est ensuite stoppée par le lavage du gel dans un tampon 5 % (v/v) d'acide acétique, 10 min sous agitation. Après rinçage de 10 min dans l'eau milliQ, le gel peut être conservé quelques jours, ou séché puis scanné.

5- Électrotransfert et immunodétection

Afin de réaliser des immunodétections des protéines d'intérêt (Western blot), nous réalisons en premier lieu des électrotransferts. Le transfert des protéines d'un gel de polyacrylamide sur une membrane de PVDF (PolyVinylidene DiFluoride) d'une porosité de 0,45 µm (Amersham Biosciences) ou de nitrocellulose (selon les applications) (Amersham Biosciences) est réalisé sous une tension de 75 V pendant 45 min, dans un tampon de transfert composé de 192 mM de glycine, 0,1 % de SDS (w/v) et 20 % de méthanol dans un tampon 25 mM Tris-HCl pH 8,2 (Towbin et coll., 1979).

Le choix de la nature de la membrane (PVDF ou nitrocellulose) est lié aux caractéristiques propres à chaque type de membrane. Le PVDF est plus hydrophobe que la nitrocellulose, ainsi lors du transfert l'éventail de poids moléculaire des protéines (bas poids et haut poids) sera plus homogène. Au contraire, sur la nitrocellulose, les protéines de faibles poids moléculaires transfèrent plus rapidement que les protéines de hauts poids moléculaires. De plus, le PVDF retient mieux les protéines, ce qui permet de ne pas perdre de matériel, il est de plus compatible avec le séquençage automatique des protéines. Cependant, les propriétés font du PVDF lui confèrent une tendance à générer plus de bruit de fond.

Lorsque l'électrotransfert est achevé, les protéines d'intérêt peuvent être détectées par immunodétection à l'aide d'anticorps spécifiques. La membrane est rincée à l'eau distillée puis mise à incuber dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) pH 7,5, contenant 5 % (w/v) de lait en poudre, pendant 1 h à 37°C (ou une nuit à 4°C). La membrane est ensuite incubée en présence du premier anticorps dilué dans du PBS additionné de 0,05 % de Tween 20 et de 5 % de lait pendant 1 h à 37°C (ou une nuit à 4°C). Après plusieurs lavages avec du PBS-Tween 20 à 0,05 %, la membrane est de nouveau mise à incuber 45 min à température ambiante avec un anticorps de chèvre spécifique du premier anticorps et couplé à la peroxydase de raifort. La membrane est ensuite lavée avec du PBS-Tween 20 à 0,05 % six fois de suite pendant 5 min. La révélation de l'activité de la peroxydase se fait par la méthode de l'ECL (électrochemoluminescence) grâce au kit ECL-Plus (ElectroChemoLuminescence, Amersham Bioscience) ou au kit supersignal (Pierce). La membrane est ensuite placée après dans une cassette de révélation puis recouverte par un film radiographique (Biomax Light 1, Kodak). La révélation de la luminescence qui a marqué le film, s'effectue grâce à une développeuse (Hyperprocessor, Amersham pharmacia biotech).

Les différents anticorps (Ac) utilisés pour les analyses par Western blot, ainsi que leurs dilutions respectives, sont récapitulés dans le Tableau XXIII :

Tableau XXIII : Condition d'utilisation des anticorps lors des Western blot

Anticorps primaire	dilution	Anticorps secondaire	dilution
Ac polyclonal de lapin anti-CGA ₄₋₁₆	1/1000	Ac anti-IgG de lapin couplé au HRP	1/20 000
Ac polyclonal de lapin anti- CGB ₅₄₇₋₅₆₀	1/1000	Ac anti-IgG de lapin couplé au HRP	1/20 000
Ac polyclonal de lapin anti- CGB ₆₁₄₋₆₂₆	1/1000	Ac anti-IgG de lapin couplé au HRP	1/20 000
Ac polyclonal de lapin anti- CGB ₅₅₋₆₈	1/1000	Ac anti-IgG de lapin couplé au HRP	1/20 000
Ac polyclonal de lapin anti- SgII ₅₆₉₋₅₈₇	1/1000	Ac anti-IgG de lapin couplé au HRP	1/20 000
Ac polyclonal de lapin anti- SgII ₁₆₅₋₁₈₂	1/1000	Ac anti-IgG de lapin couplé au HRP	1/20 000

6- Préparation d'anticorps polyclonaux

Les anticorps polyclonaux utilisés pour ce travail ont été produits dans notre laboratoire grâce à la méthode du couplage de l'haptène à l'hémocyanine (Sigma) par la glutaraldéhyde en utilisant comme antigène des peptides synthétiques. Le couplage s'effectue dans un tampon 0,1 M phosphate pH7, en présence de 6 mM glutaraldéhyde durant 12 h à 4°C. Avant injection, ce produit de couplage est additionné d'adjuvant de Freund complet. Les lapins subissent quatre injections intradermiques, correspondant chacune à 1 mg de peptide, à trois semaines d'intervalle. Dix jours après chaque injection, des prélèvements de 20 ml de sang sont effectués dans la veine marginale de l'oreille. Le sang prélevé coagule pendant une nuit à 4°C, puis après une centrifugation à 5 000 rpm pendant 30 min à 4°C, le sérum est isolé puis aliquoté (1 ml), lyophilisé et conservé à -80°C. La spécificité des anticorps est déterminée en testant un extrait de PSG par immunoréplique.

VI- Etudes structurales

1- Séquençage peptidique

Afin de déterminer la séquence N-terminale de peptides ou protéines purifiées, nous utilisons un séquenceur automatique d'Edman (Applied Biosystem 473 A). Les peptides en phase liquide sont déposés sur un filtre en fibre de verre prétraité au polybrène (BioBrene Plus Applied Biosystems). Les acides aminés convertis en phénylthiohydantoïne-amino acides (PTH-aas) sont chromatographiés par HPLC sur colonne de phase inverse Brownlee PTH C18 (granulométrie 5 µm, 220 mm x 2,1 mm). La détection des PTH-aas est réalisée à 296 nm par comparaison avec le chromatogramme des PTH-aas standards.

2- Spectrométrie de masse (MALDI-TOF)

La technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight) permet de déterminer la masse moléculaire des différents constituants d'un mélange.

Le MALDI est une méthode d'ionisation, introduite par M. Karas et F. Hillenkamp en 1988 (Karas et coll., 1988), permettant d'analyser des molécules de hautes masses moléculaires (peptides, protéines, oligonucléotides...). Les molécules à analyser sont mélangées à une quantité importante de matrice qui absorbe à la longueur d'onde du laser utilisé, ce qui a pour effet d'évaporer la matrice, entraînant avec elle l'échantillon en phase

gazeuse (Yates, 1998). Les molécules ionisées de la matrice transfèrent un proton aux molécules de l'échantillon dans la phase obtenue donnant des ions préférentiellement monochargés ($[M+H]^+$). Une fois que les ions sont formés, ils sont accélérés jusqu'à 20 keV grâce à une haute tension appliquée sur une grille et envoyés dans un tube de vol où ils volent jusqu'au détecteur. Celui-ci est maintenu sous vide. Les ions ont la même énergie, ceux qui ont une masse distincte volent à des vitesses différentes. Ainsi, les ions ayant une masse élevée voleront plus lentement que les ions ayant une masse plus faible. Leur arrivée au bout du tube de vol est détectée par un multiplicateur d'électrons et enregistrée (t_1). Le temps zéro (t_0) est le moment où le laser a tiré (Figure 62). Le temps de vol des différents ions est calculé de la façon suivante :

$$m/z = B(T-A)^2$$

avec : m : masse

z : charge

T : temps de vol (= $t_1 - t_0$)

A et B : constantes de calibration

Les spectres de masse sont relativement simples à interpréter puisque l'état de charge est généralement de 1. Ainsi les ions correspondent à MH^+ .

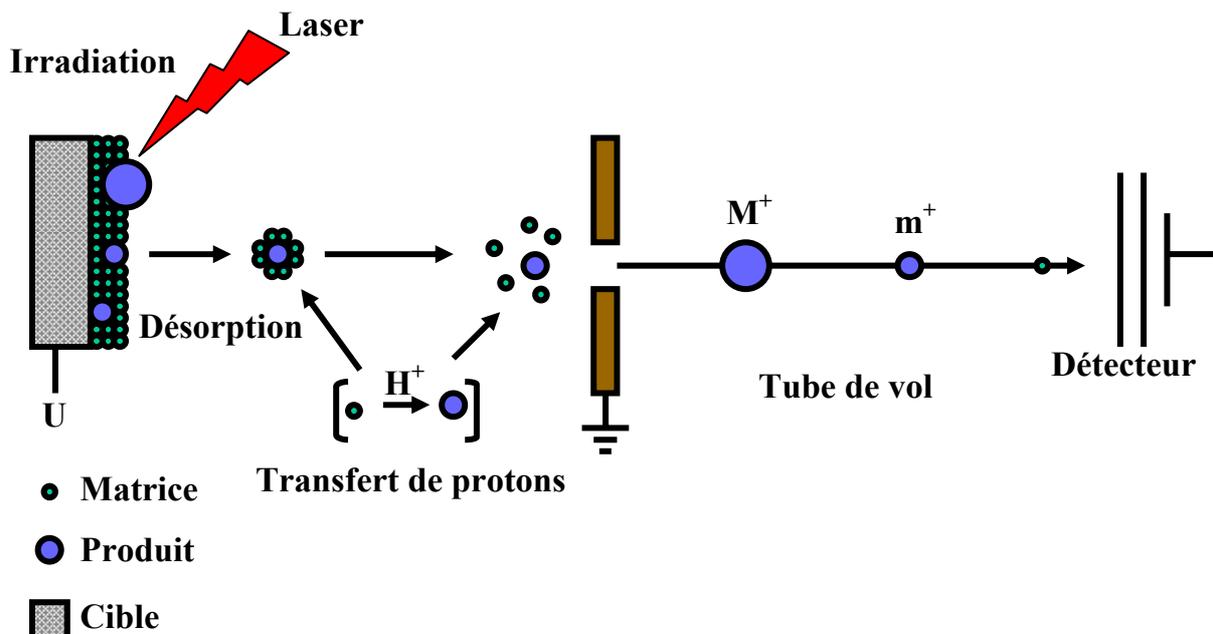


Figure 62 : Schéma du principe du MALDI-TOF

Les peptides ont été analysés par spectrométrie de masse dans notre laboratoire à des quantités de l'ordre de la femtomole. De plus, dans certaines conditions d'analyse (mode réflectron), une précision de masse très élevée (< 50 ppm) peut être obtenue. Un tel niveau de précision est indispensable à l'utilisation de la spectrométrie de masse comme technique précise d'identification des protéines (Corthals et coll., 2000).

Les mesures sont effectuées sur un spectromètre de masse Bruker (MALDI-TOF), de type BIFLEX™, muni d'un réflectron et d'un laser à azote (de longueur d'onde 337 nm). Les échantillons sont repris par 10 µl d'eau. Le dépôt se fait selon la technique dite de *sandwich* décrite par M. Kussman et collaborateurs (Kussmann et coll., 1997). Sur la cible, nous déposons tout d'abord 5 µl d'une solution contenant une matrice, constituée d'une solution saturée d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (Sigma) à 7 mg/ml dissoute dans de l'acétone. Après séchage, 5 µl d'une solution d'eau/TFA (acide trifluoroacétique), 0,1% (v/v) sont placés sur le premier dépôt puis nous ajoutons directement 5 µl de l'échantillon à tester. Le dépôt entier est recouvert ensuite par 5 µl d'une solution saturée d'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique à 7 mg/ml dissoute dans un mélange (50/50) d'acétonitrile et d'eau acidifiée à 0,1% avec du TFA. Les résultats sont obtenus en mode linéaire positif, comme en mode réflectron, avec une précision de l'ordre de 0,1%. La calibration de l'appareil, en mode réflectron, est réalisée en déposant sur la cible des peptides, de masses moléculaires connues (1046,540 Da; 1348,720 Da; 1620,807 Da; 2465,199 Da). En mode linéaire, la calibration est réalisée en déposant sur la cible des protéines d'un kit commercial (Sigma) (5 734 Da; 12 361 Da; 16 952 Da; 39 212 Da; 66 430 Da).

3- Digestion trypsique in gel

Pour permettre l'identification par spectrométrie de masse de protéines séparées par électrophorèse, nous réalisons des digestions par la trypsine de fragments de gels contenant les protéines à étudier.

Les spots d'intérêt sont excisés des gels en utilisant un embout de pipette coupé comme emporte pièce. Un morceau de gel de taille similaire, mais ne contenant aucune protéine, est également excisé. Il sera traité dans les mêmes conditions que les échantillons et servira de blanc lors des analyses par spectrométrie de masse. Les spots excisés sont conservés à -20°C dans des microtubes.

Le protocole présenté est adapté des protocoles présentés par KD. Speicher et S. Sechi (Sechi et coll., 1998 et Speicher et coll., 2000). Le spot d'intérêt est excisé du gel puis lavé

dans une solution de 25 mM de NH_4NCO_3 pH 7.8 (A). Puis il est déshydraté et décoloré par 3 lavages successifs de 30 min à 37°C dans une solution à 90 % acétonitrile. Le gel est ensuite réhydraté par 20 μl de la solution A contenant la trypsine (Promega) 0,4 μg , après 5 min le gel est recouvert par 50 μl de tampon A et laissé à incuber de 4h à toute une nuit à 37°C. Le surnageant est récupéré. Le gel est déshydraté de nouveau par une solution 70 % acétonitrile. Les peptides ainsi récupérés sont dessalés et concentrés sur cônes ZipTip C18 (Millipore) puis élués dans 4 μl d'acétonitrile 50 % avant analyse par spectrométrie de masse.

VII- Caractérisation des activités biologiques

1 – *Activité antibactérienne*

Le test antibactérien est réalisé en milieu liquide suivant les conditions expérimentales mises au point dans le laboratoire du Pr. J. Hoffman (CNRS UPR 9022, Immunité des Insectes, Strasbourg) (Bulet et coll., 1993). Les souches de bactéries testées (*Micrococcus luteus* (A270), *Bacillus megaterium* (MA), *Escherichia coli* (D22 et D31)), sont conservées à -80°C dans un milieu Luria Bertani (1 % Bactotryptone, et 0,5 % NaCl (m/v), pH 7,5) contenant 20 % de glycérol.

Les différentes souches testées sont : *Micrococcus luteus*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*. Une préculture de bactéries est réalisée pendant la nuit en aérobiose à 37°C dans du milieu Mueller-Hinton-Broth (MHB) pH 7,3. Les bactéries en phase exponentielle de croissance sont resuspendues dans du milieu MHB frais afin d'obtenir une DO initiale de 0,001 à 620 nm. Dans une plaque de microtitration (Microwell) 96 puits, 10 μl du peptide à tester en solution aqueuse stérile sont dilués dans 100 μl de culture bactérienne et incubés à 37°C pendant 18h sous agitation. Une culture témoin dans laquelle l'échantillon est remplacé par de l'eau stérile sert de contrôle. La croissance bactérienne est mesurée par $A_{620\text{ nm}}$ à l'aide d'un lecteur de plaque Titretek Multiscan MCC. L'activité antibactérienne est mise en évidence par la différence d' $A_{620\text{ nm}}$ existant entre les fractions testées et l' $A_{620\text{ nm}}$ pour 100 μl de culture témoin. La concentration minimale inhibitrice (CMI_{100}) correspond à la plus faible concentration de peptides qui inhibe totalement la croissance bactérienne.

Le test antibactérien en milieu liquide permet de calculer le pourcentage d'inhibition de croissance des bactéries en fonction de différentes concentrations en peptides. Les tests antimicrobiens en milieu liquide permettent de calculer un pourcentage d'inhibition de croissance des microorganismes en fonction de différentes concentrations de peptides.

$$\% \text{ d'inhibition de croissance} = \frac{\text{DO}_{620} \text{ nm témoin} - \text{DO}_{620} \text{ nm observée}}{\text{DO}_{620} \text{ nm observée}} \times 100$$

Les activités antimicrobiennes sont ensuite estimées en CMI = Concentration Minimale Inhibitrice.

Toutes les expériences sur les tests antibactériens ont été réalisées en triplicata. Les valeurs sont exprimées sous la forme de moyennes \pm écart type.

2- *Activité antifongique*

Les souches de champignons filamenteux testées sont : *Neurospora crassa* (CBS327-54) et *Trichophyton mentagrophytes*. Les spores sont séparées à partir des champignons filamenteux cultivés sur un milieu *cinq céréales*. Les spores récupérés sont resuspendus dans du milieu Potato Dextrose Broth (12 g/l) à raison d'environ 10^4 spores/ml. Afin d'éviter la croissance de bactéries contaminantes, nous ajoutons au milieu de la tétracycline (10 $\mu\text{g/ml}$) et de la céfotaxime (0,1 $\mu\text{g/ml}$). Dans une plaque de 96 puits, 10 μl du peptide à tester en solution sont incubés dans 100 μl de suspension de spores. La croissance se fait à 30°C sans agitation pendant 48 h. La mesure de la croissance des champignons se fait par lecture de l'absorbance à 620 nm et suivie d'une observation en microscopie optique. L'activité antifongique des peptides testés est déterminée par le pourcentage d'inhibition de la croissance des champignons par rapport à la culture témoin.

3- *Activité hémolytique*

Ce test permet de déterminer si le peptide ayant une activité antimicrobienne peut également provoquer la lyse des érythrocytes, et aussi vérifier sa potentielle toxicité. 1 ml de sang de rat est recueilli en présence de 10 mg de citrate de sodium afin d'éviter la coagulation. Le sang est centrifugé deux fois à 2500 rpm pendant 5 min à 4°C. Entre chaque centrifugation, le culot est remis en suspension dans 5 ml d'un tampon phosphate salin (PBS). Dans un tube Eppendorf, 5 μl du peptide à tester est dilué dans 45 μl de suspension d'hématies. Différentes concentrations de peptides ont été testées. Le tube est mis à incuber pendant 40 minutes sous agitation à 37°C. Après centrifugation, le surnageant est dilué dans 1 ml d'eau et la DO est mesurée à 420 nm. Un traitement des érythrocytes par 2 % de SDS correspond à une absorbance maximale de 100 %. Nous déterminons ainsi, pour une concentration donnée de peptides, leur aptitude à lyser les érythrocytes.

VIII- Réactions chimiques et enzymatiques

1- Oxydation

L'oxydation des peptides synthétiques est réalisée en présence d'acide performique. L'acide performique est le produit du mélange d'acide formique et de peroxyde d'hydrogène (9/1 v/v) agité pendant 45 min à 20°C puis refroidi à 4°C. La réaction d'oxydation se fait par dissolution du peptide synthétique dans l'acide performique pendant 30 min à 0°C. La réaction est stoppée par ajout de 5 volumes d'eau ultrapure. L'échantillon est ensuite lavé à l'eau ultrapure 6 fois (par cycles d'évaporation à la Speed-Vac et reprise dans l'eau) afin d'éliminer totalement l'acide performique.

2- Digestions protéolytiques

a- Endoprotéase Lys-C

Les digestions menées avec l'endoprotéase Lys-C ont toutes suivies le même protocole. Les digestions sont réalisées pendant 16 h à 37°C avec un ratio enzyme/substrat de 1/50 (m/m) dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.

b- Trypsine

Les digestions par la trypsine sont réalisées pendant 16 h à 37°C avec un ratio enzyme/substrat de 1/50 (m/m) dans un tampon Tris-HCl 100 mM pH 8.

Les digestions ménagées sont réalisées pendant 2 h à 37°C avec un ratio enzyme/substrat de 1/1000 (m/m) dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.

IX- Microscopie confocale

La microscopie à balayage laser permet d'effectuer des coupes virtuelles de 0,2 à 0,3 µm dans la préparation et d'enregistrer la fluorescence émise dans un seul plan. Cette technique permet de s'affranchir de la fluorescence parasite, émise par les plans extrafocaux inférieur et supérieur, enregistrée en microscopie confocale conventionnelle. De plus, il est possible de réaliser des doubles marquages.

Nous avons utilisé un microscope Zeiss (LSM 510 invert) équipé d'un objectif à immersion (x 63). La rhodamine est excitée à l'aide d'un laser hélium/néon à 543 nm et émet à 595 nm. L'orange 548 est excité à 548 nm et émet à 565 nm. Les expériences de microscopie confocale ont été réalisées par S. Grosch (Assistante Ingénieur Inserm U575).

Pour étudier les interactions entre les peptides testés et des champignons filamenteux pendant 18h, les spores des microorganismes (10^4 spores/ml) sont mises en culture, selon la méthode précédemment décrite, dans des chambres LabTek recouvertes de polylysine, à raison de 400 μ l de suspension par chambre. Les peptides marqués par une molécule fluorescente sont ensuite ajoutés au milieu de culture (30°C). Après incubation du peptide avec le microorganisme pendant une durée définie, les chambres sont lavées avec du milieu de culture puis les microorganismes sont fixés pendant 1 h avec une solution de paraformaldéhyde 4 % (dans un tampon phosphate : 0,12 M K_2HPO_4 , 0,12 M KH_2PO_4 , pH 7,2). Après une série de lavages réalisés avec du PBS, les chambres sont rincées à l'eau, puis recouvertes avec du milieu Elvanol-Mowiol et gardées à l'abri de la lumière à 4°C. (Lugardon et coll., 2001).

X- Méthodes bioinformatiques

Les séquences protéiques obtenues sont recherchées dans les banques de données *SWISS-Prot* grâce au logiciel d'interrogation BLITZ, tous les paramètres concernant la protéine reconnue étant donnés par EXPASY (<http://www.expasy.org/>) (point isoélectrique, prédiction de la structure secondaire, des modifications post-traductionnelles...).

XI- Analyse statistique

L'ensemble des données obtenues lors des tests antimicrobiens et antifongiques ont été soumis à une analyse statistique, réalisée avec Excel et basée sur la détermination des moyennes et des écarts types liés aux valeurs obtenues (chaque expérience ayant été réalisée deux fois, et lors de chaque expérience trois points pour chaque échantillon ont été réalisés).

Références Bibliographiques

A

- 1- Aarbiou J, Ertmann M, van Wetering S, van Noort P, Rook D, Rabe KF, Litvinov SV, van Krieken JH, de Boer WI et Hiemstra PS. (2002). Human neutrophil defensins induce lung epithelial cell proliferation in vitro. *J Leukoc Biol*, **72**, 1, 167-174.
- 2- Aarbiou J, Verhoosel RM, Van Wetering S, De Boer WI, Van Krieken JH, Litvinov SV, Rabe KF et Hiemstra PS. (2004). Neutrophil defensins enhance lung epithelial wound closure and mucin gene expression in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **30**, 2, 193-201.
- 3- Aardal S, Helle KB, Elsayed S, Reed RK et Serck-Hanssen G. (1993). Vasostatins, comprising the N-terminal domain of chromogranin A, suppress tension in isolated human blood vessel segments. *J Neuroendocrinol*, **5**, 4, 405-412.
- 4- Agarwal SK et Marshall GD. (2001). Dexamethasone promotes type 2 cytokine production primarily through inhibition of type 1 cytokines. *J Interferon Cytokine Res*, **21**, 3, 147-155.
- 5- Agneter E, Sitte HH, Stöckl-Hiesleitner S, Fischer-Colbrie R, Winkler H et Singer EA. (1995). Sustained dopamine release induced by secretoneurin in the striatum of the rat: a microdialysis study. *J Neurochem*, **65**, 2, 622-625.
- 6- Ait-Ali D, Turquier V, Grumolato L, Yon L, Jourdain M, Alexandre D, Eiden LE, Vaudry H et Anouar Y. (2004). The proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 stimulate neuropeptide gene transcription and secretion in adrenochromaffin cells via activation of extracellularly regulated kinase 1/2 and p38 protein kinases, and activator protein 1. *Mol Endocrinol*, **18**, 7, 1721-1739.
- 7- Akira S, Takeda K et Kaisho T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*, **2**, 8, 675-680.
- 8- Amato A, Corti A, Serio R et Mulè F. (2005). Inhibitory influence of chromogranin A N-terminal fragment (vasostatin-1) on the spontaneous contractions of rat proximal colon. *Regul Pept*, **130**, 1-2, 42-47.

- 9- An LL, Yang YH, Ma XT, Lin YM, Li G, Song YH et Wu KF. (2005). LL-37 enhances adaptive antitumor immune response in a murine model when genetically fused with M-CSFR (J6-1) DNA vaccine. *Leuk Res*, **29**, 5, 535-543.
- 10- Anouar Y, Desmoucelles C, Yon L, Leprince J, Breault L, Gallo-Payet N et Vaudry H. (1998). Identification of a novel secretogranin II-derived peptide (SgII(187-252)) in adult and fetal human adrenal glands using antibodies raised against the human recombinant peptide. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**, 8, 2944-2951.
- 11- Aranha C, Gupta S et Reddy KV. (2004). Contraceptive efficacy of antimicrobial peptide Nisin: in vitro and in vivo studies. *Contraception*, **69**, 4, 333-338.
- 12- Arden SD, Rutherford NG, Guest PC, Curry WJ, Bailyes EM, Johnston CF et Hutton JC. (1994). The post-translational processing of chromogranin A in the pancreatic islet: involvement of the eukaryote subtilisin PC2. *Biochem J*, **298 Pt 3**, 1994Mar15, 521-528.
- 13- Arrighi RB, Nakamura C, Miyake J, Hurd H et Burgess JG. (2002). Design and activity of antimicrobial peptides against sporogonic-stage parasites causing murine malaras. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**, 7, 2104-2110.
- 14- Aunis D, Bouclier M, Pescheloché M et Mandel P. (1977). Properties of membrane-bound dopamine-beta-hydroxylase in chromaffin granules from bovine adrenal medulla. *J Neurochem*, **29**, 3, 439-447.
- 15- Aunis D et García AG. (1981). Correlation between catecholamine secretion from bovine isolated chromaffin cells and [3H]-ouabain binding to plasma membranes. *Br J Pharmacol*, **72**, 1, 31-40.
- 16- Aunis D, Kannot T, Nakazato Y et Kumakura K. (1998). The adrenal chromaffin cell *Hokkaido University Press Sapporo*, **1**,, 293-304.

B

- 17- Bader MW, Navarre WW, Shiau W, Nikaido H, Frye JG, McClelland M, Fang FC et Miller SI. (2003). Regulation of *Salmonella typhimurium* virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides. *Mol Microbiol*, **50**, 1, 219-230.
- 18- Bagella L, Scocchi M et Zanetti M. (1995). cDNA sequences of three sheep myeloid cathelicidins. *FEBS Lett*, **376**, 3, 225-228.
- 19- Baker MA, Maloy WL, Zasloff M et Jacob LS. (1993). Anticancer efficacy of Magainin2 and analogue peptides. *Cancer Res*, **53**, 13, 3052-3057.

-
- 20- Bals R. (2000). Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res*, **1**, 3, 141-150.
- 21- Banks P et Helle K. (1965). The release of protein from the stimulated adrenal medulla. *Biochem J*, **97**, 3, 40C-41C.
- 22- Bargsten G et Grube D. (1992). Serotonin storage and chromogranins: an experimental study in rat gastric endocrine cells. *J Histochem Cytochem*, **40**, 8, 1147-1155.
- 23- Barth E, Myrvik QM, Wagner W et Gristina AG. (1989). In vitro and in vivo comparative colonization of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* on orthopaedic implant materials. *Biomaterials*, **10**, 5, 325-328.
- 24- Bauer JW et Fischer-Colbrie R. (1991). Primary structure of bovine chromogranin B deduced from cDNA sequence. *Biochim Biophys Acta*, **1089**, 1, 124-126.
- 25- Bauer SH, Zhang XY, Van Dongen W, Claeys M et Przybylski M. (1999). Chromogranin A from bovine adrenal medulla: molecular characterization of glycosylations, phosphorylations, and sequence heterogeneities by mass spectrometry. *Anal Biochem*, **274**, 1, 69-80.
- 26- Befus AD, Mowat C, Gilchrist M, Hu J, Solomon S et Bateman A. (1999). Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. *J Immunol*, **163**, 2, 947-953.
- 27- Benedum UM, Baeuerle PA, Konecki DS, Frank R, Powell J, Mallet J et Huttner WB. (1986). The primary structure of bovine chromogranin A: a representative of a class of acidic secretory proteins common to a variety of peptidergic cells. *EMBO J*, **5**, 7, 1495-1502.
- 28- Benedum UM, Lamouroux A, Konecki DS, Rosa P, Hille A, Baeuerle PA, Frank R, Lottspeich F, Mallet J et Huttner WB. (1987). The primary structure of human secretogranin I (chromogranin B): comparison with chromogranin A reveals homologous terminal domains and a large intervening variable region. *EMBO J*, **6**, 5, 1203-1211.
- 29- Benjannet S, Leduc R, Adrouche N, Falgout JP, Marcinkiewicz M, Seidah NG, Mbikay M, Lazure C et Chretien M. (1987). Chromogranin B (secretogranin I), a putative precursor of two novel pituitary peptides through processing at paired basic residues. *FEBS Lett*, **224**, 1, 142-148.
- 30- Benschop RJ, Nieuwenhuis EE, Tromp EA, Godaert GL, Ballieux RE et van Doornen LJ. (1994). Effects of beta-adrenergic blockade on immunologic and cardiovascular changes induced by mental stress. *Circulation*, **89**, 2, 762-769.

-
- 31- Beutler B. (2005). The Toll-like receptors: analysis by forward genetic methods. *Immunogenetics*, **57**, 6, 385-392.
- 32- Biragyn A, Belyakov IM, Chow YH, Dimitrov DS, Berzofsky JA et Kwak LW. (2002). DNA vaccines encoding human immunodeficiency virus-1 glycoprotein 120 fusions with proinflammatory chemoattractants induce systemic and mucosal immune responses. *Blood*, **100**, 4, 1153-1159.
- 33- Bitsche M, Schrott-Fischer A, Hinterhoelzl J, Fischer-Colbrie R, Sergi C, Glueckert R, Humpel C et Marksteiner J. (2006). First localization and biochemical identification of chromogranin B- and secretoneurin-like immunoreactivity in the fetal human vagal/nucleus solitary complex. *Regul Pept*, **134**, 2-3, 97-104.
- 34- Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeier R et Postel W. (1982). Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J Biochem Biophys Methods*, **6**, 4, 317-339.
- 35- Blaschko H, Comline RS, Schneider FH, Silver M et Smith AD. (1967). Secretion of a chromaffin granule protein, chromogranin, from the adrenal gland after splanchnic stimulation. *Nature*, **215**, 96, 58-59.
- 36- Blois A, Holmsen H, Martino G, Corti A, Metz-Boutigue MH et Helle KB. (2006). Interactions of chromogranin A-derived vasostatins and monolayers of phosphatidylserine, phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine. *Regul Pept*, **134**, 1, 30-37.
- 37- Boman HG, Agerberth B et Boman A. (1993). Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine. *Infect Immun*, **61**, 7, 2978-2984.
- 38- Boman HG. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol*, **13**, 1995, 61-92.
- 39- Boutahricht M, Guillemot J, Montero-Hadjadje M, Bellafqih S, El Ouezzani S, Alaoui A, Yon L, Vaudry H, Anouar Y et Magoul R. (2005). Biochemical characterisation and immunohistochemical localisation of the secretogranin II-derived peptide EM66 in the hypothalamus of the jerboa (*Jaculus orientalis*): modulation by food deprivation. *J Neuroendocrinol*, **17**, 6, 372-378.
- 40- Bowdish DM, Davidson DJ, Speert DP et Hancock RE. (2004). The human cationic peptide LL-37 induces activation of the extracellular signal-regulated kinase

- and p38 kinase pathways in primary human monocytes. *J Immunol*, **172**, 6, 3758-3765.
- 41- Bowdish DM, Davidson DJ, Lau YE, Lee K, Scott MG et Hancock RE. (2005a). Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *J Leukoc Biol*, **77**, 4, 451-459.
- 42- Bowdish DM, Davidson DJ, Scott MG et Hancock RE. (2005b). Immunomodulatory activities of small host defense peptides. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 5, 1727-1732.
- 43- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 1976May7, 248-254.
- 44- Braff MH, Hawkins MA, Di Nardo A, Lopez-Garcia B, Howell MD, Wong C, Lin K, Streib JE, Dorschner R, Leung DY et coll.. (2005). Structure-function relationships among human cathelicidin peptides: dissociation of antimicrobial properties from host immunostimulatory activities. *J Immunol*, **174**, 7, 4271-4278.
- 45- Briolat J, Wu SD, Mahata SK, Gonthier B, Bagnard D, Chasserot-Golaz S, Helle KB, Aunis D et Metz-Boutigue MH. (2005). New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin A. *Cell Mol Life Sci*, **62**, 3, 377-385.
- 46- Brogden KA, Kalfa VC, Ackermann MR, Palmquist DE, McCray PB et Tack BF. (2001). The ovine cathelicidin SMAP29 kills ovine respiratory pathogens in vitro and in an ovine model of pulmonary infection. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**, 1, 331-334.
- 47- Brown DR, Schmidt B et Kretzschmar HA. (1996). Role of microglia and host prion protein in neurotoxicity of a prion protein fragment. *Nature*, **380**, 6572, 345-347.
- 48- Budtz-Jørgensen E. (1990). Etiology, pathogenesis, therapy, and prophylaxis of oral yeast infections. *Acta Odontol Scand*, **48**, 1, 61-69.
- 49- Bulet P, Dimarcq JL, Hetru C, Lagueux M, Charlet M, Hegy G, Van Dorsselaer A et Hoffmann JA. (1993). A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J Biol Chem*, **268**, 20, 14893-14897.
- 50- Bulet P, Stöcklin R et Menin L. (2004). Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. *Immunol Rev*, **198**, 2004Apr, 169-184.

- 51- Burns JL, Ramsey BW et Smith AL. (1993). Clinical manifestations and treatment of pulmonary infections in cystic fibrosis. *Adv Pediatr Infect Dis*, **8**, 1993, 53-66.
- 52- Burrows LL, Stark M, Chan C, Glukhov E, Sinnadurai S et Deber CM. (2006). Activity of novel non-amphipathic cationic antimicrobial peptides against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother*, **57**, 5, 899-907.

C

- 53- Carnell L et Moore HP. (1994). Transport via the regulated secretory pathway in semi-intact PC12 cells: role of intra-cisternal calcium and pH in the transport and sorting of secretogranin II. *J Cell Biol*, **127**, 3, 693-705.
- 54- Castex F. (2003). Stress, pathologies et immunité; chapitre 4 : Définitions et aspects de l'immunité *Médecine-Sciences Flammarion*, **1**, 47-52.
- 55- Cerra MC, De Iuri L, Angelone T, Corti A et Tota B. (2006). Recombinant N-terminal fragments of chromogranin-A modulate cardiac function of the Langendorff-perfused rat heart. *Basic Res Cardiol*, **101**, 1, 43-52.
- 56- Chakravarty S et Herkenham M. (2005). Toll-like receptor 4 on nonhematopoietic cells sustains CNS inflammation during endotoxemia, independent of systemic cytokines. *J Neurosci*, **25**, 7, 1788-1796.
- 57- Chan YR et Gallo RL. (1998). PR-39, a syndecan-inducing antimicrobial peptide, binds and affects p130(Cas). *J Biol Chem*, **273**, 44, 28978-28985.
- 58- Chan YR, Zanetti M, Gennaro R et Gallo RL. (2001). Anti-microbial activity and cell binding are controlled by sequence determinants in the anti-microbial peptide PR-39. *J Invest Dermatol*, **116**, 2, 230-235.
- 59- Chanat E, Weiss U, Huttner WB et Tooze SA. (1993). Reduction of the disulfide bond of chromogranin B (secretogranin I) in the trans-Golgi network causes its missorting to the constitutive secretory pathways. *EMBO J*, **12**, 5, 2159-2168.
- 60- Chanat E, Weiss U et Huttner WB. (1994). The disulfide bond in chromogranin B, which is essential for its sorting to secretory granules, is not required for its aggregation in the trans-Golgi network. *FEBS Lett*, **351**, 2, 225-230.
- 61- Chavakis T, Cines DB, Rhee JS, Liang OD, Schubert U, Hammes HP, Higazi AA, Nawroth PP, Preissner KT et Bdeir K. (2004). Regulation of neovascularization by human neutrophil peptides (alpha-defensins): a link between inflammation and angiogenesis. *FASEB J*, **18**, 11, 1306-1308.

- 62- Chelmicka-Schorr E, Checinski M et Arnason BG. (1988). Chemical sympathectomy augments the severity of experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, **17**, 4, 347-350.
- 63- Chertov O, Michiel DF, Xu L, Wang JM, Tani K, Murphy WJ, Longo DL, Taub DD et Oppenheim JJ. (1996). Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem*, **271**, 6, 2935-2940.
- 64- Chiari M, Cretich M, Corti A, Damin F, Pirri G et Longhi R. (2005). Peptide microarrays for the characterization of antigenic regions of human chromogranin A. *Proteomics*, **5**, 14, 3600-3603.
- 65- Ciesielski-Treska J, Ulrich G, Taupenot L, Chasserot-Golaz S, Corti A, Aunis D et Bader MF. (1998). Chromogranin A induces a neurotoxic phenotype in brain microglial cells. *J Biol Chem*, **273**, 23, 14339-14346.
- 66- Ciesielski-Treska J, Ulrich G, Chasserot-Golaz S, Zwiller J, Revel MO, Aunis D et Bader MF. (2001). Mechanisms underlying neuronal death induced by chromogranin A-activated microglia. *J Biol Chem*, **276**, 16, 13113-13120.
- 67- Cohn DV, Zangerle R, Fischer-Colbrie R, Chu LL, Elting JJ, Hamilton JW et Winkler H. (1982). Similarity of secretory protein I from parathyroid gland to chromogranin A from adrenal medulla. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 19, 6056-6059.
- 68- Coleman MB, Lu ZH, Smith CM, Adams JG, Harrell A, Plonczynski M et Steinberg MH. (1995). Two missense mutations in the beta-globin gene can cause severe beta thalassemia. Hemoglobin Medicine Lake (beta 32[B14]leucine-->glutamine; 98 [FG5] valine-->methionine). *J Clin Invest*, **95**, 2, 503-509.
- 69- Collins S, Cao W, Daniel KW, Dixon TM, Medvedev AV, Onuma H et Surwit R. (2001). Adrenoceptors, uncoupling proteins, and energy expenditure. *Exp Biol Med (Maywood)*, **226**, 11, 982-990.
- 70- Conlon JM, Hamberger B et Grimelius L. (1992). Isolation of peptides arising from the specific posttranslational processing of chromogranin A and chromogranin B from human pheochromocytoma tissue. *Peptides*, **13**, 4, 639-644.
- 71- Cook DN, Pisetsky DS et Schwartz DA. (2004). Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol*, **5**, 10, 975-979.

- 72- Corthals GL, Wasinger VC, Hochstrasser DF et Sanchez JC. (2000). The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research. *Electrophoresis*, **21**, 6, 1104-1115.
- 73- Corti A, Mannarino C, Mazza R, Angelone T, Longhi R et Tota B. (2004). Chromogranin A N-terminal fragments vasostatin-1 and the synthetic CGA 7-57 peptide act as cardiostatins on the isolated working frog heart. *Gen Comp Endocrinol*, **136**, 2, 217-224.
- 74- Costerton JW, Stewart PS et Greenberg EP. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, **284**, 5418, 1318-1322.
- 75- Cubeddu LX, O'Connor DT et Parmer RJ. (1995). Plasma chromogranin A: a marker of serotonin release and of emesis associated with cisplatin chemotherapy. *J Clin Oncol*, **13**, 3, 681-687.
- 76- Curry WJ, Barkatullah SC, Johansson AN, Quinn JG, Norlen P, Connolly CK, McCollum AP et McVicar CM. (2002). WE-14, a chromogranin a-derived neuropeptide. *Ann N Y Acad Sci*, **971**, 2002Oct, 311-316.

D

- 77- D'Este L et Renda T. (1995). Phylogenetic study on distribution and chromogranin/secretogranin content of histamine immunoreactive elements in the gut. *Ital J Anat Embryol*, **100 Suppl 1**, 1995, 403-410.
- 78- Dagan A, Efron L, Gaidukov L, Mor A et Ginsburg H. (2002). In vitro antiplasmodium effects of dermaseptin S4 derivatives. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**, 4, 1059-1066.
- 79- Dahma H, Gourlet P, Vandermeers A, Vandermeers-Piret MC et Robberecht P. (2001). Evidence that the chromogranin B fragment 368-417 extracted from a pheochromocytoma is phosphorylated. *Peptides*, **22**, 9, 1491-1499.
- 80- Dankert J, Hogt AH et Feijen J. (1986). Biomedical polymers : bacterial adhesion, colonization and infection. *crit rev biocompatibility*, **2**,, 219-301.
- 81- Dar-Odeh NS et Shehabi AA. (2003). Oral candidosis in patients with removable dentures. *Mycoses*, **46**, 5-6, 187-191.
- 82- Davidson DJ, Currie AJ, Reid GS, Bowdish DM, MacDonald KL, Ma RC, Hancock RE et Speert DP. (2004). The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J Immunol*, **172**, 2, 1146-1156.

- 83- De Jesus N, Franco D, Paul A, Wimmer E et Cello J. (2005). Mutation of a single conserved nucleotide between the cloverleaf and internal ribosome entry site attenuates poliovirus neurovirulence. *J Virol*, **79**, 22, 14235-14243.
- 84- DeLucca AJ, Bland JM, Jacks TJ, Grimm C, Cleveland TE et Walsh TJ. (1997). Fungicidal activity of cecropin A. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**, 2, 481-483.
- 85- De Lucca AJ et Walsh TJ. (1999). Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*, **43**, 1, 1-11.
- 86- Deftos LJ. (1991). Chromogranin A: its role in endocrine function and as an endocrine and neuroendocrine tumor marker. *Endocr Rev*, **12**, 2, 181-187.
- 87- Degorce F, Goumon Y, Jacquemart L, Vidaud C, Bellanger L, Pons-Anicet D, Seguin P, Metz-Boutigue MH et Aunis D. (1999). A new human chromogranin A (CgA) immunoradiometric assay involving monoclonal antibodies raised against the unprocessed central domain (145-245). *Br J Cancer*, **79**, 1, 65-71.
- 88- Depreitere J, Durinx C, Wang Z, Coen E, Lambeir AM, Scharpé S, De Potter W et Nouwen EJ. (2002). Presence and release of SR-17 (chromogranin B(586-602)) in the porcine splenic nerve and its enzymatic degradation by CD26/dipeptidyl peptidase IV. *Regul Pept*, **106**, 1-3, 71-79.
- 89- Depreitere J, Wang Z, Liang F, Coen E et Nouwen EJ. (2004). Presence and release of the chromogranin B-derived secretolytin-like peptide KR-11 from the porcine spleen. *Regul Pept*, **122**, 2, 99-107.
- 90- Dhabhar FS. (1998). Stress-induced enhancement of cell-mediated immunity. *Ann N Y Acad Sci*, **840**, 1998May1, 359-372.
- 91- Dillen L, Miserez B, Claeys M, Aunis D et De Potter W. (1993). Posttranslational processing of proenkephalins and chromogranins/secretogranins. *Neurochem Int*, **22**, 4, 315-352.
- 92- Dittié AS et Tooze SA. (1995). Characterization of the endopeptidase PC2 activity towards secretogranin II in stably transfected PC12 cells. *Biochem J*, **310** (Pt 3), 1995Sep15, 777-787.
- 93- Doblinger A, Becker A, Seidah NG et Laslop A. (2003). Proteolytic processing of chromogranin A by the prohormone convertase PC2. *Regul Pept*, **111**, 1-3, 111-116.

- 94- Doh-ura K, Perryman S, Race R et Chesebro B. (1995). Identification of differentially expressed genes in scrapie-infected mouse neuroblastoma cells. *Microb Pathog*, **18**, 1, 1-9.
- 95- Dopazo A, Lovenberg TW, Danielson PE, Ottiger HP et Sutcliffe JG. (1993). Primary structure of mouse secretogranin III and its absence from deficient mice. *J Mol Neurosci*, **4**, 4, 225-233.
- 96- Dorschner RA, Pestonjamas VK, Tamakuwala S, Ohtake T, Rudisill J, Nizet V, Agerberth B, Gudmundsson GH et Gallo RL. (2001). Cutaneous injury induces the release of cathelicidin anti-microbial peptides active against group A Streptococcus. *J Invest Dermatol*, **117**, 1, 91-97.
- 97- Drapeau GR. (1976). Protease from Staphylococcus aureus. *Methods Enzymol*, **45**, 1976, 469-475.
- 98- Dunzendorfer S, Schratzberger P, Reinisch N, Kähler CM et Wiedermann CJ. (1998). Secretoneurin, a novel neuropeptide, is a potent chemoattractant for human eosinophils. *Blood*, **91**, 5, 1527-1532.
- 99- Dunzendorfer S, Feistritzer C, Enrich B et Wiedermann CJ. (2002). Neuropeptide-induced inhibition of IL-16 release from eosinophils. *Neuroimmunomodulation*, **10**, 4, 217-223.

E

- 100- Egan MF, Kojima M, Callicott JH, Goldberg TE, Kolachana BS, Bertolino A, Zaitsev E, Gold B, Goldman D, Dean M et coll.. (2003). The BDNF val66met polymorphism affects activity-dependent secretion of BDNF and human memory and hippocampal function. *Cell*, **112**, 2, 257-269.
- 101- Ehrenstein G et Lecar H. (1977). Electrically gated ionic channels in lipid bilayers. *Q Rev Biophys*, **10**, 1, 1-34.
- 102- Ehrnsperger C et Volkandt W. (2001). Major vault protein is a substrate of endogenous protein kinases in CHO and PC12 cells. *Biol Chem*, **382**, 10, 1463-1471.
- 103- Eiden LE, Huttner WB, Mallet J, O'Connor DT, Winkler H et Zanini A. (1987). A nomenclature proposal for the chromogranin/secretogranin proteins. *Neuroscience*, **21**, 3, 1019-1021.
- 104- Elsbach P. (2003). What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses? *J Clin Invest*, **111**, 11, 1643-1645.

- 105- Elssner A, Duncan M, Gavrilin M et Wewers MD. (2004). A novel P2X7 receptor activator, the human cathelicidin-derived peptide LL37, induces IL-1 beta processing and release. *J Immunol*, **172**, 8, 4987-4994.
- 106- Eriksson B, Arnberg H, Oberg K, Hellman U, Lundqvist G, Wernstedt C et Wilander E. (1990). A polyclonal antiserum against chromogranin A and B--a new sensitive marker for neuroendocrine tumours. *EMBL/GenBank/DDBJ databases*, **122**, 2, 145-155.
- 107- Etienne O, Picart C, Taddei C, Haikel Y, Dimarcq JL, Schaaf P, Voegel JC, Ogier JA et Egles C. (2004). Multilayer polyelectrolyte films functionalized by insertion of defensin: a new approach to protection of implants from bacterial colonization. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**, 10, 3662-3669.

F

- 108- Falkensammer G, Fischer-Colbrie R et Winkler H. (1985). Biogenesis of chromaffin granules: incorporation of sulfate into chromogranin B and into a proteoglycan. *J Neurochem*, **45**, 5, 1475-1480.
- 109- Fasciotto BH, Gorr SU, DeFranco DJ, Levine MA et Cohn DV. (1989). Pancreastatin, a presumed product of chromogranin-A (secretory protein-I) processing, inhibits secretion from porcine parathyroid cells in culture. *Endocrinology*, **125**, 3, 1617-1622.
- 110- Fasciotto BH, Trauss CA, Greeley GH et Cohn DV. (1993). Parastatin (porcine chromogranin A347-419), a novel chromogranin A-derived peptide, inhibits parathyroid cell secretion. *Endocrinology*, **133**, 2, 461-466.
- 111- Ferrero E, Scabini S, Magni E, Foglieni C, Belloni D, Colombo B, Curnis F, Villa A, Ferrero ME et Corti A. (2004). Chromogranin A protects vessels against tumor necrosis factor alpha-induced vascular leakage. *FASEB J*, **18**, 3, 554-556.
- 112- Finlay BB et Hancock RE. (2004). Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? *Nat Rev Microbiol*, **2**, 6, 497-504.
- 113- Fischer-Colbrie R, Schachinger M, Zangerle R et Winkler H. (1982). Dopamine beta-hydroxylase and other glycoproteins from the soluble content and the membranes of adrenal chromaffin granules: isolation and carbohydrate analysis. *J Neurochem*, **38**, 3, 725-732.

- 114- Fischer-Colbrie R et Frischenschlager I. (1985a). Immunological characterization of secretory proteins of chromaffin granules: chromogranins A, chromogranins B, and enkephalin-containing peptides. *J Neurochem*, **44**, 6, 1854-1861.
- 115- Fischer-Colbrie R, Lassmann H, Hagn C et Winkler H. (1985b). Immunological studies on the distribution of chromogranin A and B in endocrine and nervous tissues. *Neuroscience*, **16**, 3, 547-555.
- 116- Fischer-Colbrie R, Diez-Guerra J, Emson PC et Winkler H. (1986a). Bovine chromaffin granules: immunological studies with antisera against neuropeptide Y, [Met]enkephalin and bombesin. *Neuroscience*, **18**, 1, 167-174.
- 117- Fischer-Colbrie R, Hagn C, Kilpatrick L et Winkler H. (1986b). Chromogranin C: a third component of the acidic proteins in chromaffin granules. *J Neurochem*, **47**, 1, 318-321.
- 118- Fischer-Colbrie R, Hagn C et Schober M. (1987). Chromogranins A, B, and C: widespread constituents of secretory vesicles. *Ann N Y Acad Sci*, **493**, 1987, 120-134.
- 119- Fischer-Colbrie R, Gutierrez J, Hsu CM, Iacangelo A et Eiden LE. (1990). Sequence analysis, tissue distribution and regulation by cell depolarization, and second messengers of bovine secretogranin II (chromogranin C) mRNA. *J Biol Chem*, **265**, 16, 9208-9213.
- 120- Fischer-Colbrie R, Kirchmair R, Kähler CM, Wiedermann CJ et Saria A. (2005). Secretoneurin: a new player in angiogenesis and chemotaxis linking nerves, blood vessels and the immune system. *Curr Protein Pept Sci*, **6**, 4, 373-385.
- 121- Flanagan T, Taylor L, Poulter L, Viveros OH et Diliberto EJ. (1990). A novel 1745-dalton pyroglutamyl peptide derived from chromogranin B is in the bovine adrenomedullary chromaffin vesicle. *Cell Mol Neurobiol*, **10**, 4, 507-523.
- 122- Forss-Petter S, Danielson P, Battenberg E, Bloom F et Sutcliffe JG. (1989). Nucleotide sequence and cellular distribution of rat chromogranin B (secretogranin I) mRNA in the neuroendocrine system. *J Mol Neurosci*, **1**, 2, 63-75.
- 123- Forsythe P, Curry WJ, Johnston CF, Harriott P, MacMahon J et Ennis M. (1997). The modulatory effects of WE-14 on histamine release from rat peritoneal mast cells. *Inflamm Res*, **46 Suppl 1**, 1997Mar, S13-14.

- 124- Frank RW, Gennaro R, Schneider K, Przybylski M et Romeo D. (1990). Amino acid sequences of two proline-rich bactericins. Antimicrobial peptides of bovine neutrophils. *J Biol Chem*, **265**, 31, 18871-18874.
- 125- Frohm Nilsson M, Sandstedt B, Sørensen O, Weber G, Borregaard N et Ståhle-Bäckdahl M. (1999). The human cationic antimicrobial protein (hCAP18), a peptide antibiotic, is widely expressed in human squamous epithelia and colocalizes with interleukin-6. *Infect Immun*, **67**, 5, 2561-2566.
- 126- Fukumoto K, Nagaoka I, Yamataka A, Kobayashi H, Yanai T, Kato Y et Miyano T. (2005). Effect of antibacterial cathelicidin peptide CAP18/LL-37 on sepsis in neonatal rats. *Pediatr Surg Int*, **21**, 1, 20-24.

G

- 127- Gabay JE. (1994). Ubiquitous natural antibiotics. *Science*, **264**, 5157, 373-374.
- 128- Gadroy P, Stridsberg M, Capon C, Michalski JC, Strub JM, Van Dorselaer A, Aunis D et Metz-Boutigue MH. (1998). Phosphorylation and O-glycosylation sites of human chromogranin A (CGA79-439) from urine of patients with carcinoid tumors. *J Biol Chem*, **273**, 51, 34087-34097.
- 129- Ganz T, Metcalf JA, Gallin JI, Boxer LA et Lehrer RI. (1988). Microbicidal/cytotoxic proteins of neutrophils are deficient in two disorders: Chediak-Higashi syndrome and "specific" granule deficiency. *J Clin Invest*, **82**, 2, 552-556.
- 130- Ganz T, Selsted ME et Lehrer RI. (1990). Defensins. *Eur J Haematol*, **44**, 1, 1-8.
- 131- Ganz T et Lehrer RI. (1995). Defensins. *Pharmacol Ther*, **66**, 2, 191-205.
- 132- Gao Y, Lecker S, Post MJ, Hietaranta AJ, Li J, Volk R, Li M, Sato K, Saluja AK, Steer ML et coll.. (2000). Inhibition of ubiquitin-proteasome pathway-mediated I kappa B alpha degradation by a naturally occurring antibacterial peptide. *J Clin Invest*, **106**, 3, 439-448.
- 133- García JR, Krause A, Schulz S, Rodríguez-Jiménez FJ, Klüver E, Adermann K, Forssmann U, Frimpong-Boateng A, Bals R et Forssmann WG. (2001). Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity. *FASEB J*, **15**, 10, 1819-1821.
- 134- Gasnier C, Lugardon K, Ruh O, Strub JM, Aunis D et Metz-Boutigue MH. (2004). Characterization and location of post-translational modifications on chromogranin B from bovine adrenal medullary chromaffin granules. *Proteomics*, **4**, 6, 1789-1801.

- 135- Gauweiler B, Weihe E, Hartschuh W et Yanaihara N. (1988). Presence and coexistence of chromogranin A and multiple neuropeptides in Merkel cells of mammalian oral mucosa. *Neurosci Lett*, **89**, 2, 121-126.
- 136- Gennaro R, Skerlavaj B et Romeo D. (1989). Purification, composition, and activity of two bactericins, antibacterial peptides of bovine neutrophils. *Infect Immun*, **57**, 10, 3142-3146.
- 137- Gennaro R, Scocchi M, Merluzzi L et Zanetti M. (1998). Biological characterization of a novel mammalian antimicrobial peptide. *Biochim Biophys Acta*, **1425**, 2, 361-368.
- 138- Gennaro R et Zanetti M. (2000). Structural features and biological activities of the cathelicidin-derived antimicrobial peptides. *Biopolymers*, **55**, 1, 31-49.
- 139- Gerasimenko OV, Gerasimenko JV, Tepikin AV et Petersen OH. (1995). ATP-dependent accumulation and inositol trisphosphate- or cyclic ADP-ribose-mediated release of Ca²⁺ from the nuclear envelope. *Cell*, **80**, 3, 439-444.
- 140- Gerdes HH, Phillips E et Huttner WB. (1988). The primary structure of rat secretogranin II deduced from a cDNA sequence. *Nucleic Acids Res*, **16**, 24, 11811.
- 141- Gerdes HH, Rosa P, Phillips E, Baeuerle PA, Frank R, Argos P et Huttner WB. (1989). The primary structure of human secretogranin II, a widespread tyrosine-sulfated secretory granule protein that exhibits low pH- and calcium-induced aggregation. *J Biol Chem*, **264**, 20, 12009-12015.
- 142- Ghia JE, Crenner F, Metz-Boutigue MH, Aunis D et Angel F. (2004a). Effects of a chromogranin-derived peptide (CgA 47-66) in the writhing nociceptive response induced by acetic acid in rats. *Regul Pept*, **119**, 3, 199-207.
- 143- Ghia JE, Crenner F, Metz-Boutigue MH, Aunis D et Angel F. (2004b). The effect of a chromogranin A-derived peptide (CgA4-16) in the writhing nociceptive response induced by acetic acid in rats. *Life Sci*, **75**, 15, 1787-1799.
- 144- Ghia JE, Crenner F, Rohr S, Meyer C, Metz-Boutigue MH, Aunis D et Angel F. (2004). A role for chromogranin A (4-16), a vasostatin-derived peptide, on human colonic motility. An in vitro study. *Regul Pept*, **121**, 1-3, 31-39.
- 145- Giacometti A, Cirioni O, Barchiesi F, Fortuna M et Scalise G. (1999). In-vitro activity of cationic peptides alone and in combination with clinically used antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*, **44**, 5, 641-645.

- 146- Giacometti A, Cirioni O, Greganti G, Quarta M et Scalise G. (1998). In vitro activities of membrane-active peptides against gram-positive and gram-negative aerobic bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, **42**, 12, 3320-3324.
- 147- Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Mocchegiani F, D'Amato G, Circo R, Orlando F, Skerlavaj B, Silvestri C, Saba V et coll.. (2004). Cathelicidin peptide sheep myeloid antimicrobial peptide-29 prevents endotoxin-induced mortality in rat models of septic shock. *Am J Respir Crit Care Med*, **169**, 2, 187-194.
- 148- Glombik MM, Krömer A, Salm T, Huttner WB et Gerdes HH. (1999). The disulfide-bonded loop of chromogranin B mediates membrane binding and directs sorting from the trans-Golgi network to secretory granules. *EMBO J*, **18**, 4, 1059-1070.
- 149- Gorr SU, Shioi J et Cohn DV. (1989). Interaction of calcium with porcine adrenal chromogranin A (secretory protein-I) and chromogranin B (secretogranin I). *Am J Physiol*, **257**, 2 Pt 1, E247-254.
- 150- Goumon Y, Strub JM, Moniatte M, Nullans G, Poteur L, Hubert P, Van Dorsselaer A, Aunis D et Metz-Boutigue MH. (1996). The C-terminal bisphosphorylated proenkephalin-A-(209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity. *Eur J Biochem*, **235**, 3, 516-525.
- 151- Goumon Y, Lugardon K, Kieffer B, Lefèvre JF, Van Dorsselaer A, Aunis D et Metz-Boutigue MH. (1998). Characterization of antibacterial COOH-terminal proenkephalin-A-derived peptides (PEAP) in infectious fluids. Importance of enkelytin, the antibacterial PEAP209-237 secreted by stimulated chromaffin cells. *J Biol Chem*, **273**, 45, 29847-29856.
- 152- Goumon Y, Lugardon K, Gadroy P, Strub JM, Welters ID, Stefano GB, Aunis D et Metz-Boutigue MH. (2000). Processing of proenkephalin-A in bovine chromaffin cells. Identification of natural derived fragments by N-terminal sequencing and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Biol Chem*, **275**, 49, 38355-38362.
- 153- Grimm MC, Ben-Baruch A, Taub DD, Howard OM, Wang JM et Oppenheim JJ. (1998). Opiate inhibition of chemokine-induced chemotaxis. *Ann N Y Acad Sci*, **840**, 1998May1, 9-20.
- 154- Grube D, Aunis D, Bader F, Cetin Y, Jörns A et Yoshie S. (1986). Chromogranin A (CGA) in the gastro-entero-pancreatic (GEP) endocrine system. I. CGA in the mammalian endocrine pancreas. *Histochemistry*, **85**, 6, 441-452.

- 155- Gruber B, Schratzberger P, Kähler CM, Dunzendorfer S, Bellmann R, Reinisch N et Wiedermann CJ. (1997). Staurosporine-dependent activation of human endothelial cell monolayers for neutrophil adherence by secretoneurin. *Peptides*, **18**, 9, 1445-1447.
- 156- Grynspan-Winogard O. (1975). Ultrastructure of chromaffin cells *waverly Press*, **1**, 25, 132-258.
- 157- Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B et Salcedo R. (1996). The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem*, **238**, 2, 325-332.
- 158- Guillemot J, Anouar Y, Montero-Hadjadje M, Grouzmann E, Grumolato L, Roshmaninho-Salgado J, Turquier V, Duparc C, Lefebvre H, Plouin PF et coll.. (2006). Circulating EM66 is a highly sensitive marker for the diagnosis and follow-up of pheochromocytoma. *Int J Cancer*, **118**, 8, 2003-2012.
- 159- Guimarães S et Moura D. (2001). Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacol Rev*, **53**, 2, 319-356.
- 160- Guthmiller JM, Vargas KG, Srikantha R, Schomberg LL, Weistroffer PL, McCray PB et Tack BF. (2001). Susceptibilities of oral bacteria and yeast to mammalian cathelicidins. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**, 11, 3216-3219.

H

- 161- Hagn C, Schmid KW, Fischer-Colbrie R et Winkler H. (1986). Chromogranin A, B, and C in human adrenal medulla and endocrine tissues. *Lab Invest*, **55**, 4, 405-411.
- 162- Håkanson R, Ding XQ, Norlén P et Chen D. (1995). Circulating pancreastatin is a marker for the enterochromaffin-like cells of the rat stomach. *Gastroenterology*, **108**, 5, 1445-1452.
- 163- Hancock RE. (1997a). Antibacterial peptides and the outer membranes of gram-negative bacilli. *J Med Microbiol*, **46**, 1, 1-3.
- 164- Hancock RE. (1997b). Peptide antibiotics. *Lancet*, **349**, 9049, 418-422.
- 165- Hancock RE et Diamond G. (2000). The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defences. *Trends Microbiol*, **8**, 9, 402-410.
- 166- Hancock RE et Rozek A. (2002). Role of membranes in the activities of antimicrobial cationic peptides. *FEMS Microbiol Lett*, **206**, 2, 143-149.

- 167- Harder J et Schröder JM. (2005). Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins. *J Leukoc Biol*, **77**, 4, 476-486.
- 168- Harwig SS, Kokryakov VN, Swiderek KM, Aleshina GM, Zhao C et Lehrer RI. (1995). Prophenin-1, an exceptionally proline-rich antimicrobial peptide from porcine leukocytes. *FEBS Lett*, **362**, 1, 65-69.
- 169- Haskó G, Elenkov IJ, Kvetan V et Vizi ES. (1995). Differential effect of selective block of alpha 2-adrenoreceptors on plasma levels of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6 and corticosterone induced by bacterial lipopolysaccharide in mice. *J Endocrinol*, **144**, 3, 457-462.
- 170- Hayward BE, Moran V, Strain L et Bonthron DT. (1998). Bidirectional imprinting of a single gene: GNAS1 encodes maternally, paternally, and biallelically derived proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 26, 15475-15480.
- 171- Heilborn JD, Nilsson MF, Jimenez CI, Sandstedt B, Borregaard N, Tham E, Sørensen OE, Weber G et Stähle M. (2005). Antimicrobial protein hCAP18/LL-37 is highly expressed in breast cancer and is a putative growth factor for epithelial cells. *Int J Cancer*, **114**, 5, 713-719.
- 172- Helle KB et Angeletti RH. (1994). Chromogranin A: a multipurpose prohormone? *Acta Physiol Scand*, **152**, 1, 1-10.
- 173- Helle KB. (2004). The granin family of uniquely acidic proteins of the diffuse neuroendocrine system: comparative and functional aspects. *Biol Rev Camb Philos Soc*, **79**, 4, 769-794.
- 174- Hench PS, Kendall EC, Slocumb CH et Polley HF. (1950). Effects of cortisone acetate and pituitary ACTH on rheumatoid arthritis, rheumatic fever and certain other conditions. *Arch Med Interna*, **85**, 4, 545-666.
- 175- Hendy GN, Li T, Girard M, Feldstein RC, Mulay S, Desjardins R, Day R, Karaplis AC, Tremblay ML et Canaff L. (2006). Targeted ablation of the chromogranin A (Chga) gene: normal neuroendocrine dense core secretory granules and increased expression of other granins. *Mol Endocrinol*, **1**,, 0-1.
- 176- Hertz CJ, Wu Q, Porter EM, Zhang YJ, Weismüller KH, Godowski PJ, Ganz T, Randell SH et Modlin RL. (2003). Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. *J Immunol*, **171**, 12, 6820-6826.
- 177- Hiemstra PS, Fernie-King BA, McMichael J, Lachmann PJ et Sallenave JM. (2004). Antimicrobial peptides: mediators of innate immunity as templates for the

- development of novel anti-infective and immune therapeutics. *Curr Pharm Des*, **10**, 23, 2891-2905.
- 178- Hillarp NA. (1958). Isolation and some biochemical properties of the catechol amine granules in the cow adrenal medulla. *Acta Physiol Scand*, **43**, 1, 82-96.
- 179- Hille A, Rosa P et Huttner WB. (1984). Tyrosine sulfation: a post-translational modification of proteins destined for secretion? *FEBS Lett*, **177**, 1, 129-134.
- 180- Hiratsuka T, Mukae H, Iiboshi H, Ashitani J, Nabeshima K, Minematsu T, Chino N, Ihi T, Kohno S et Nakazato M. (2003). Increased concentrations of human beta-defensins in plasma and bronchoalveolar lavage fluid of patients with diffuse panbronchiolitis. *Thorax*, **58**, 5, 425-430.
- 181- Hoflehner J, Eder U, Laslop A, Seidah NG, Fischer-Colbrie R et Winkler H. (1995). Processing of secretogranin II by prohormone convertases: importance of PC1 in generation of secretoneurin. *FEBS Lett*, **360**, 3, 294-298.
- 182- Holthuis JC, Jansen EJ et Martens GJ. (1996a). Secretogranin III is a sulfated protein undergoing proteolytic processing in the regulated secretory pathway. *J Biol Chem*, **271**, 30, 17755-17760.
- 183- Holthuis JC et Martens GJ. (1996b). The neuroendocrine proteins secretogranin II and III are regionally conserved and coordinately expressed with proopiomelanocortin in *Xenopus* intermediate pituitary. *J Neurochem*, **66**, 6, 2248-2256.
- 184- Hong RW, Shchepetov M, Weiser JN et Axelsen PH. (2003). Transcriptional profile of the *Escherichia coli* response to the antimicrobial insect peptide cecropin A. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**, 1, 1-6.
- 185- Hosaka M, Suda M, Sakai Y, Izumi T, Watanabe T et Takeuchi T. (2004). Secretogranin III binds to cholesterol in the secretory granule membrane as an adapter for chromogranin A. *J Biol Chem*, **279**, 5, 3627-3634.
- 186- Hosaka M, Watanabe T, Sakai Y, Kato T et Takeuchi T. (2005). Interaction between secretogranin III and carboxypeptidase E facilitates prohormone sorting within secretory granules. *J Cell Sci*, **118**, Pt 20, 4785-4795.
- 187- Huang HJ, Ross CR et Blecha F. (1997). Chemoattractant properties of PR-39, a neutrophil antibacterial peptide. *J Leukoc Biol*, **61**, 5, 624-629.
- 188- Huang HW. (2000). Action of antimicrobial peptides: two-state model. *Biochemistry*, **39**, 29, 8347-8352.

- 189- Huh YH, Bahk SJ, Ghee JY et Yoo SH. (2005). Subcellular distribution of chromogranins A and B in bovine adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett*, **579**, 23, 5145-5151.
- 190- Huh YH, Chu SY, Park SY, Huh SK et Yoo SH. (2006). Role of nuclear chromogranin B in inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated nuclear Ca²⁺ mobilization. *Biochemistry*, **45**, 4, 1212-1226.
- 191- Hultmark D, Engström A, Andersson K, Steiner H, Bennich H et Boman HG. (1983). Insect immunity. Attacins, a family of antibacterial proteins from *Hyalophora cecropia*. *EMBO J*, **2**, 4, 571-576.
- 192- Humbert JP, Matter N, Artault JC, Köppler P et Malviya AN. (1996). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor is located to the inner nuclear membrane vindicating regulation of nuclear calcium signaling by inositol 1,4,5-trisphosphate. Discrete distribution of inositol phosphate receptors to inner and outer nuclear membranes. *J Biol Chem*, **271**, 1, 478-485.
- 193- Huttner WB. (1982). Sulphation of tyrosine residues-a widespread modification of proteins. *Nature*, **299**, 5880, 273-276.
- 194- Huttner WB. (1987a). Protein tyrosine sulfation *Trends Biochem Sci*, **12**, 361-363.
- 195- Huttner WB et Benedum UM. (1987b). Chromogranin A and pancreastatin. *Nature*, **325**, 6102, 305.
- 196- Huttner WB et Natori S. (1995). Regulated secretion. Helper proteins for neuroendocrine secretion. *Curr Biol*, **5**, 3, 242-245.
- 197- Huttner WB, Gerdes HH et Rosa P. (1991). The granin (chromogranin/secretogranin) family. *Trends Biochem Sci*, **16**, 1, 27-30.
- 198- Hutton JC, Hansen F et Peshavaria M. (1985). beta-Granins: 21 kDa co-secreted peptides of the insulin granule closely related to adrenal medullary chromogranin A. *FEBS Lett*, **188**, 2, 336-340.

I

- 199- Iacopino AM et Wathen WF. (1992). Oral candidal infection and denture stomatitis: a comprehensive review. *J Am Dent Assoc*, **123**, 1, 46-51.
- 200- Ikeda Y, Young LH, Scalia R, Ross CR et Lefler AM. (2001). PR-39, a proline/arginine-rich antimicrobial peptide, exerts cardioprotective effects in myocardial ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res*, **49**, 1, 69-77.

- 201- Imbrogno S, Angelone T, Corti A, Adamo C, Helle KB et Tota B. (2004). Influence of vasostatsins, the chromogranin A-derived peptides, on the working heart of the eel (*Anguilla anguilla*): negative inotropy and mechanism of action. *Gen Comp Endocrinol*, **139**, 1, 20-28.
- 202- Ischia R, Lovisetti-Scamihorn P, Hogue-Angeletti R, Wolkersdorfer M, Winkler H et Fischer-Colbrie R. (1997). Molecular cloning and characterization of NESP55, a novel chromogranin-like precursor of a peptide with 5-HT1B receptor antagonist activity. *J Biol Chem*, **272**, 17, 11657-11662.
- 203- Ischia R, Gasser RW, Fischer-Colbrie R, Eder U, Pagani A, Cubeddu LX, Lovisetti-Scamihorn P, Finkenstedt G, Laslop A et Winkler H. (2000). Levels and molecular properties of secretoneurin-immunoreactivity in the serum and urine of control and neuroendocrine tumor patients. *J Clin Endocrinol Metab*, **85**, 1, 355-360.
- 204- Islam D, Bandholtz L, Nilsson J, Wigzell H, Christensson B, Agerberth B et Gudmundsson G. (2001). Downregulation of bactericidal peptides in enteric infections: a novel immune escape mechanism with bacterial DNA as a potential regulator. *Nat Med*, **7**, 2, 180-185.
- 205- Iwazaki T, Shibata I, Niwa S et Matsumoto I. (2004). Selective reduction of chromogranin A-like immunoreactivities in the prefrontal cortex of schizophrenic subjects: a postmortem study. *Neurosci Lett*, **367**, 3, 293-297.

J

- 206- Jacob L et Zasloff M. (1994). Potential therapeutic applications of magainins and other antimicrobial agents of animal origin. *Ciba Found Symp*, **186**, 1994, 197-216; discussion 216-23.
- 207- Jacque C. (2003). Stress, pathologies et immunité; chapitre 5 : Supports moléculaires des effets du stress. Système neuro-immunitaire *Médecine-Sciences Flammarion*, **1**,, 53-61.
- 208- Jansen B, Peters G et Pulverer G. (1988). Mechanisms and clinical relevance of bacterial adhesion to polymers. *J Biomater Appl*, **2**, 4, 520-543.
- 209- Jean-Eric G, Isabelle P, Francis C, Marie-Hélène MB, Dominique A et Fabielle A. (2005). Effect of acetic acid or trypsin application on rat colonic motility in vitro and modulation by two synthetic fragments of chromogranin A. *Regul Pept*, **124**, 1-3, 27-35.

- 210- Jetschmann JU, Benschop RJ, Jacobs R, Kemper A, Oberbeck R, Schmidt RE et Schedlowski M. (1997). Expression and in-vivo modulation of alpha- and beta-adrenoceptors on human natural killer (CD16+) cells. *J Neuroimmunol*, **74**, 1-2, 159-164.
- 211- Johnson JD, Campisi J, Sharkey CM, Kennedy SL, Nickerson M et Fleshner M. (2005). Adrenergic receptors mediate stress-induced elevations in extracellular Hsp72. *J Appl Physiol*, **99**, 5, 1789-1795.

K

- 212- Kähler CM, Bellmann R, Reinisch N, Schratzberger P, Gruber B et Wiedermann CJ. (1996). Stimulation of human skin fibroblast migration by the neuropeptide secretoneurin. *Eur J Pharmacol*, **304**, 1-3, 135-139.
- 213- Kähler CM, Kirchmair R, Kaufmann G, Kähler ST, Reinisch N, Fischer-Colbrie R, Hogue-Angeletti R, Winkler H et Wiedermann CJ. (1997). Inhibition of proliferation and stimulation of migration of endothelial cells by secretoneurin in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 5, 932-939.
- 214- Kähler CM et Fischer-Colbrie R. (2000). Secretoneurin--a novel link between the nervous and the immune system. Conservation of the sequence and functional aspects. *Adv Exp Med Biol*, **482**, 2000, 279-290.
- 215- Kähler CM, Pischel A, Kaufmann G et Wiedermann CJ. (2001). Influence of neuropeptides on neutrophil adhesion and transmigration through a lung fibroblast barrier in vitro. *Exp Lung Res*, **27**, 1, 25-46.
- 216- Kähler CM, Kaufmann G, Kähler ST et Wiedermann CJ. (2002a). The neuropeptide secretoneurin stimulates adhesion of human monocytes to arterial and venous endothelial cells in vitro. *Regul Pept*, **110**, 1, 65-73.
- 217- Kähler CM, Schratzberger P, Kaufmann G, Hochleitner B, Bechter O, Götsch C, Wöll E, Marschang P, Herold M et Wiedermann CJ. (2002b). Transendothelial migration of leukocytes and signalling mechanisms in response to the neuropeptide secretoneurin. *Regul Pept*, **105**, 1, 35-46.
- 218- Kalcheim C, Langley K et Unsicker K. (2002). From the neural crest to chromaffin cells: introduction to a session on chromaffin cell development. *Ann N Y Acad Sci*, **971**, 2002Oct, 544-546.
- 219- Kanno T, Asada N, Yanase H, Iwanaga T, Ozaki T, Nishikawa Y, Iguchi K, Mochizuki T, Hoshino M et Yanaihara N. (1999). Salivary secretion of highly

- concentrated chromogranin a in response to noradrenaline and acetylcholine in isolated and perfused rat submandibular glands. *Exp Physiol*, **84**, 6, 1073-1083.
- 220- Karas M et Hillenkamp F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem*, **60**, 20, 2299-2301.
- 221- Kawashima K et Fujii T. (2004). Expression of non-neuronal acetylcholine in lymphocytes and its contribution to the regulation of immune function. *Front Biosci*, **9**, 2004Sep1, 2063-2085.
- 222- Khan A, Tischler AS, Patwardhan NA et DeLellis RA. (2003). Calcitonin immunoreactivity in neoplastic and hyperplastic parathyroid glands: an immunohistochemical study. *Endocr Pathol*, **14**, 3, 249-255.
- 223- Kiang WL, Krusius T, Finne J, Margolis RU et Margolis RK. (1982). Glycoproteins and proteoglycans of the chromaffin granule matrix. *J Biol Chem*, **257**, 4, 1651-1659.
- 224- Kidd M, Modlin IM, Mane SM, Camp RL et Shapiro MD. (2006). Q RT-PCR detection of chromogranin A: a new standard in the identification of neuroendocrine tumor disease. *Ann Surg*, **243**, 2, 273-280.
- 225- Kim T et Loh YP. (2005a). Chromogranin A: a surprising link between granule biogenesis and hypertension. *J Clin Invest*, **115**, 7, 1711-1713.
- 226- Kim T, Zhang CF, Sun Z, Wu H et Loh YP. (2005b). Chromogranin A deficiency in transgenic mice leads to aberrant chromaffin granule biogenesis. *J Neurosci*, **25**, 30, 6958-6961.
- 227- Kimura N, Funakoshi A, Aunis D, Tateishi K, Miura W et Nagura H. (1995). Immunohistochemical Localization of Chromostatin and Pancreastatin, Chromogranin A-Derived Bioactive Peptides, in Normal and Neoplastic Neuroendocrine Tissues. *Endocr Pathol*, **6**, 1, 35-43.
- 228- Kirchmair R, Gee P, Hogue-Angeletti R, Laslop A, Fischer-Colbrie R et Winkler H. (1992). Immunological characterization of the endoproteases PC1 and PC2 in adrenal chromaffin granules and in the pituitary gland. *FEBS Lett*, **297**, 3, 302-305.
- 229- Kirchmair R, Hogue-Angeletti R, Gutierrez J, Fischer-Colbrie R et Winkler H. (1993). Secretoneurin--a neuropeptide generated in brain, adrenal medulla and other endocrine tissues by proteolytic processing of secretogranin II (chromogranin C). *Neuroscience*, **53**, 2, 359-365.

- 230- Kirchmair R, Egger M, Walter DH, Eisterer W, Niederwanger A, Woell E, Nagl M, Pedrini M, Murayama T, Frauscher S et coll.. (2004a). Secretoneurin, an angiogenic neuropeptide, induces postnatal vasculogenesis. *Circulation*, **110**, 9, 1121-1127.
- 231- Kirchmair R, Gander R, Egger M, Hanley A, Silver M, Ritsch A, Murayama T, Kaneider N, Sturm W, Kearny M et coll.. (2004b). The neuropeptide secretoneurin acts as a direct angiogenic cytokine in vitro and in vivo. *Circulation*, **109**, 6, 777-783.
- 232- Kishimoto A, Nishiyama K, Nakanishi H, Uratsuji Y, Nomura H, Takeyama Y et Nishizuka Y. (1985). Studies on the phosphorylation of myelin basic protein by protein kinase C and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J Biol Chem*, **260**, 23, 12492-12499.
- 233- Kitao Y, Inada T, Arinami T, Hirotsu C, Aoki S, Iijima Y, Yamauchi T et Yagi G. (2000). A contribution to genome-wide association studies: search for susceptibility loci for schizophrenia using DNA microsatellite markers on chromosomes 19, 20, 21 and 22. *Psychiatr Genet*, **10**, 3, 139-143.
- 234- Koedel U, Rupprecht T, Angele B, Heesemann J, Wagner H, Pfister HW et Kirschning CJ. (2004). MyD88 is required for mounting a robust host immune response to *Streptococcus pneumoniae* in the CNS. *Brain*, **127**, Pt 6, 1437-1445.
- 235- Kojic EM et Darouiche RO. (2004). *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev*, **17**, 2, 255-267.
- 236- Kokryakov VN, Harwig SS, Panyutich EA, Shevchenko AA, Aleshina GM, Shamova OV, Korneva HA et Lehrer RI. (1993). Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett*, **327**, 2, 231-236.
- 237- Konecki DS, Benedum UM, Gerdes HH et Huttner WB. (1987). The primary structure of human chromogranin A and pancreastatin. *J Biol Chem*, **262**, 35, 17026-17030.
- 238- Kragol G, Lovas S, Varadi G, Condie BA, Hoffmann R et Otvos L. (2001). The antibacterial peptide pyrrolicin inhibits the ATPase actions of DnaK and prevents chaperone-assisted protein folding. *Biochemistry*, **40**, 10, 3016-3026.
- 239- Kralinger MT, Hinterhölzl J, Troger J, Nguyen QA, Kremser B, Fischer-Colbrie R et Kieselbach GF. (2003). Elevated levels of secretoneurin in the rabbit aqueous

- humor in response to formaldehyde irritation. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, **241**, 7, 577-581.
- 240- Kreiner E. (1982). Weight and shape of the human adrenal medulla in various age groups. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*, **397**, 1, 7-15.
- 241- Krisch K, Buxbaum P, Horvat G, Krisch I, Neuhold N, Ulrich W et Srikanta S. (1986). Monoclonal antibody HISL-19 as an immunocytochemical probe for neuroendocrine differentiation. Its application in diagnostic pathology. *Am J Pathol*, **123**, 1, 100-108.
- 242- Kroesen S, Marksteiner J, Leitner B, Hogue-Angeletti R, Fischer-Colbrie R et Winkler H. (1996). Rat brain: distribution of immunoreactivity of PE-11, a peptide derived from chromogranin B. *Eur J Neurosci*, **8**, 12, 2679-2689.
- 243- Ku SK, Lee HS et Lee JH. (2005). An immunohistochemical study of chromogranin A and Sp-1 immunoreactive cells in the gastrointestinal tract of ovariectomized rats. *J Vet Sci*, **6**, 3, 191-196.
- 244- Kumagai S, Kanagawa S, Morinobu A, Takada M, Nakamura K, Sugai S, Maruya E et Saji H. (1997). Association of a new allele of the TAP2 gene, TAP2*Bky2 (Val577), with susceptibility to Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*, **40**, 9, 1685-1692.
- 245- Kurosaka K, Chen Q, Yarovinsky F, Oppenheim JJ et Yang D. (2005). Mouse cathelin-related antimicrobial peptide chemoattracts leukocytes using formyl peptide receptor-like 1/mouse formyl peptide receptor-like 2 as the receptor and acts as an immune adjuvant. *J Immunol*, **174**, 10, 6257-6265.
- 246- Kussmann M, Lässig U, Stürmer CA, Przybylski M et Roepstorff P. (1997). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide mapping of the neural cell adhesion protein neurolin purified by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis or acidic precipitation. *J Mass Spectrom*, **32**, 5, 483-493.

<i>L</i>

- 247- Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 5259, 680-685.
- 248- Landén M, Grenfeldt B, Davidsson P, Stridsberg M, Regland B, Gottfries CG et Blennow K. (1999). Reduction of chromogranin A and B but not C in the

- cerebrospinal fluid in subjects with schizophrenia. *Eur Neuropsychopharmacol*, **9**, 4, 311-315.
- 249- Lang K, Drell TL, Niggemann B, Zänker KS et Entschladen F. (2003). Neurotransmitters regulate the migration and cytotoxicity in natural killer cells. *Immunol Lett*, **90**, 2-3, 165-172.
- 250- Larhammar D. (1996). Structural diversity of receptors for neuropeptide Y, peptide YY and pancreatic polypeptide. *Regul Pept*, **65**, 3, 165-174.
- 251- Laslop A, Weiss C, Savaria D, Eiter C, Tooze SA, Seidah NG et Winkler H. (1998). Proteolytic processing of chromogranin B and secretogranin II by prohormone convertases. *J Neurochem*, **70**, 1, 374-383.
- 252- Laslop A et Mahata SK. (2002). Neuropeptides and chromogranins: session overview. *Ann N Y Acad Sci*, **971**, 2002Oct, 294-299.
- 253- Lau YE, Rozek A, Scott MG, Goosney DL, Davidson DJ et Hancock RE. (2005). Interaction and cellular localization of the human host defense peptide LL-37 with lung epithelial cells. *Infect Immun*, **73**, 1, 583-591.
- 254- Lazure C, Paquet L, Litthauer D, Naudé RJ, Oelofsen W et Chrétien M. (1990). The ostrich pituitary contains a major peptide homologous to mammalian chromogranin A(1-76). *Peptides*, **11**, 1, 79-87.
- 255- Le Douarin N. (1980). Migration and differentiation of neural crest cells. *Curr Top Dev Biol*, **16**, 1980, 31-85.
- 256- Le Douarin NM et Kalcheim C. (1999). The neural crest *Cambridge University Press*, **1**, 1-5.
- 257- Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ et Marshak-Rothstein A. (2002). Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature*, **416**, 6881, 603-607.
- 258- Lechner T, Adlassnig C, Humpel C, Kaufmann WA, Maier H, Reinstadler-Kramer K, Hinterhölzl J, Mahata SK, Jellinger KA et Marksteiner J. (2004). Chromogranin peptides in Alzheimer's disease. *Exp Gerontol*, **39**, 1, 101-113.
- 259- Lee DG, Kim DH, Park Y, Kim HK, Kim HN, Shin YK, Choi CH et Hahm KS. (2001). Fungicidal effect of antimicrobial peptide, PMAP-23, isolated from porcine myeloid against *Candida albicans*. *Biochem Biophys Res Commun*, **282**, 2, 570-574.

- 260- Lee SN, Hwang JR et Lindberg I. (2006). Neuroendocrine protein 7B2 can be inactivated by phosphorylation within the secretory pathway. *J Biol Chem*, **281**, 6, 3312-3320.
- 261- Lehrer RI, Selsted ME, Szklarek D et Fleischmann J. (1983). Antibacterial activity of microbicidal cationic proteins 1 and 2, natural peptide antibiotics of rabbit lung macrophages. *Infect Immun*, **42**, 1, 10-14.
- 262- Lehrer RI, Daher K, Ganz T et Selsted ME. (1985). Direct inactivation of viruses by MCP-1 and MCP-2, natural peptide antibiotics from rabbit leukocytes. *J Virol*, **54**, 2, 467-472.
- 263- Lehrer RI, Ganz T, Szklarek D et Selsted ME. (1988). Modulation of the in vitro candidacidal activity of human neutrophil defensins by target cell metabolism and divalent cations. *J Clin Invest*, **81**, 6, 1829-1835.
- 264- Leitner B, Fischer-Colbrie R, Scherzer G et Winkler H. (1996). Secretogranin II: relative amounts and processing to secretoneurin in various rat tissues. *J Neurochem*, **66**, 3, 1312-1317.
- 265- Leung KP, Crowe TD, Abercrombie JJ, Molina CM, Bradshaw CJ, Jensen CL, Luo Q et Thompson GA. (2005). Control of oral biofilm formation by an antimicrobial decapeptide. *J Dent Res*, **84**, 12, 1172-1177.
- 266- Lichtenstein A, Ganz T, Selsted ME et Lehrer RI. (1986). In vitro tumor cell cytotoxicity mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes. *Blood*, **68**, 6, 1407-1410.
- 267- Linard CG, Mbikay M, Seidah NG et Chretien M. (1990). Primary structure of mouse chromogranin B deduced from cDNA sequence. *Nucleic Acids Res*, **18**, 5, 1298.
- 268- Linde CM, Hoffner SE, Refai E et Andersson M. (2001). In vitro activity of PR-39, a proline-arginine-rich peptide, against susceptible and multi-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother*, **47**, 5, 575-580.
- 269- Liu L, Roberts AA et Ganz T. (2003). By IL-1 signaling, monocyte-derived cells dramatically enhance the epidermal antimicrobial response to lipopolysaccharide. *J Immunol*, **170**, 1, 575-580.
- 270- Ludtke SJ, He K, Heller WT, Harroun TA, Yang L et Huang HW. (1996). Membrane pores induced by magainin. *Biochemistry*, **35**, 43, 13723-13728.
- 271- Lugardon K, Raffner R, Goumon Y, Corti A, Delmas A, Bulet P, Aunis D et Metz-Boutigue MH. (2000). Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1,

- the N-terminal fragment of chromogranin A. *J Biol Chem*, **275**, 15, 10745-10753.
- 272- Lugardon K, Chasserot-Golaz S, Kieffer AE, Maget-Dana R, Nullans G, Kieffer B, Aunis D et Metz-Boutigue MH. (2001). Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A-(47-66)-derived peptide. *J Biol Chem*, **276**, 38, 35875-35882.
- 273- Lukinius A, Stridsberg M et Wilander E. (2003). Cellular expression and specific intragranular localization of chromogranin A, chromogranin B, and synaptophysin during ontogeny of pancreatic islet cells: an ultrastructural study. *Pancreas*, **27**, 1, 38-46.
- 274- Lüders T, Birkemo GA, Fimland G, Nissen-Meyer J et Nes IF. (2003). Strong synergy between a eukaryotic antimicrobial peptide and bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*, **69**, 3, 1797-1799.

M

- 275- Madden KS, Sanders VM et Felten DL. (1995). Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **35**, 1995, 417-448.
- 276- Madden KS, Felten SY, Felten DL, Sundaresan PR et Livnat S. (1989). Sympathetic neural modulation of the immune system. I. Depression of T cell immunity in vivo and vitro following chemical sympathectomy. *Brain Behav Immun*, **3**, 1, 72-89.
- 277- Maestroni GJ et Mazzola P. (2003). Langerhans cells beta 2-adrenoceptors: role in migration, cytokine production, Th priming and contact hypersensitivity. *J Neuroimmunol*, **144**, 1-2, 91-99.
- 278- Mahapatra NR, O'Connor DT, Vaingankar SM, Hikim AP, Mahata M, Ray S, Staite E, Wu H, Gu Y, Dalton N et coll.. (2005). Hypertension from targeted ablation of chromogranin A can be rescued by the human ortholog. *J Clin Invest*, **115**, 7, 1942-1952.
- 279- Mahata SK, O'Connor DT, Mahata M, Yoo SH, Taupenot L, Wu H, Gill BM et Parmer RJ. (1997). Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin a fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. *J Clin Invest*, **100**, 6, 1623-1633.

- 280- Mahata SK, Mahata M, Wen G, Wong WB, Mahapatra NR, Hamilton BA et O'Connor DT. (2004). The catecholamine release-inhibitory "catestatin" fragment of chromogranin a: naturally occurring human variants with different potencies for multiple chromaffin cell nicotinic cholinergic responses. *Mol Pharmacol*, **66**, 5, 1180-1191.
- 281- Mahoney MM, Lee AY, Brezinski-Caliguri DJ et Huttner KM. (1995). Molecular analysis of the sheep cathelin family reveals a novel antimicrobial peptide. *FEBS Lett*, **377**, 3, 519-522.
- 282- Malosio ML, Giordano T, Laslop A et Meldolesi J. (2004). Dense-core granules: a specific hallmark of the neuronal/neurosecretory cell phenotype. *J Cell Sci*, **117**, Pt 5, 743-749.
- 283- Malviya AN, Rogue P et Vincendon G. (1990). Stereospecific inositol 1,4,5-[³²P]trisphosphate binding to isolated rat liver nuclei: evidence for inositol trisphosphate receptor-mediated calcium release from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 23, 9270-9274.
- 284- Marcaud V, Laplanche JL, Defontaines B, Beaudry P, Vital A, Vincent D, Sazdovitch V, Hauw JJ, Latinville D, Jung P et coll.. (2003). [Usefulness of molecular genetic analysis of the PRNP gene in patients with cerebellar ataxia: a new case of fatal familial insomnia] *Rev Neurol (Paris)*, **159**, 2, 199-202.
- 285- Marcinkiewicz M, Ramla D, Seidah NG et Chrétien M. (1994). Developmental expression of the prohormone convertases PC1 and PC2 in mouse pancreatic islets. *Endocrinology*, **135**, 4, 1651-1660.
- 286- Marksteiner J, Bauer R, Kaufmann WA, Weiss E, Barnas U et Maier H. (1999). PE-11, a peptide derived from chromogranin B, in the human brain. *Neuroscience*, **91**, 3, 1155-1170.
- 287- Mbikay M, Grant SG, Sirois F, Tadros H, Skowronski J, Lazure C, Seidah NG, Hanahan D et Chrétien M. (1989). cDNA sequence of neuroendocrine protein 7B2 expressed in beta cell tumors of transgenic mice. *Int J Pept Protein Res*, **33**, 1, 39-45.
- 288- McPhee JB, Scott MG et Hancock RE. (2005). Design of host defence peptides for antimicrobial and immunity enhancing activities. *Comb Chem High Throughput Screen*, **8**, 3, 257-272.
- 289- Merrifield RB. (1965). Automated synthesis of peptides. *Science*, **150**, 693, 178-185.

- 290- Metz-Boutigue MH, Garcia-Sablone P, Hogue-Angeletti R et Aunis D. (1993). Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites. *Eur J Biochem*, **217**, 1, 247-257.
- 291- Metz-Boutigue MH, Goumon Y, Lugardon K, Strub JM et Aunis D. (1998). Antibacterial peptides are present in chromaffin cell secretory granules. *Cell Mol Neurobiol*, **18**, 2, 249-266.
- 292- Metz-Boutigue MH, Goumon Y, Strub JM, Lugardon K et Aunis D. (2003a). Antimicrobial chromogranins and proenkephalin-A-derived peptides: Antibacterial and antifungal activities of chromogranins and proenkephalin-A-derived peptides. *Ann N Y Acad Sci*, **992**, 2003May, 168-178.
- 293- Metz-Boutigue MH, Kieffer AE, Goumon Y et Aunis D. (2003b). Innate immunity: involvement of new neuropeptides. *Trends Microbiol*, **11**, 12, 585-592.
- 294- Miller C, Kirchmair R, Troger J, Saria A, Fleischhacker WW, Fischer-Colbrie R, Benzer A et Winkler H. (1996). CSF of neuroleptic-naive first-episode schizophrenic patients: levels of biogenic amines, substance P, and peptides derived from chromogranin A (GE-25) and secretogranin II (secretoneurin). *Biol Psychiatry*, **39**, 11, 911-918.
- 295- Milligan ED, Langer SJ, Sloane EM, He L, Wieseler-Frank J, O'Connor K, Martin D, Forsayeth JR, Maier SF, Johnson K et coll.. (2005). Controlling pathological pain by adenovirally driven spinal production of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10. *Eur J Neurosci*, **21**, 8, 2136-2148.
- 296- Mohey R, Jørgensen LB, Møller BK, Black FT, Kjems J et Obel N. (2005). Detection and quantification of proviral HIV-1 184 M/V in circulating CD4(+) T cells of patients on HAART with a viremia less than 1,000 copies/ml. *J Clin Virol*, **34**, 4, 257-267.
- 297- Montero-Hadjadje M, Pelletier G, Yon L, Li S, Guillemot J, Magoul R, Tillet Y, Vaudry H et Anouar Y. (2003). Biochemical characterization and immunocytochemical localization of EM66, a novel peptide derived from secretogranin II, in the rat pituitary and adrenal glands. *J Histochem Cytochem*, **51**, 8, 1083-1095.
- 298- Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DM, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, Roche FM, Mu R, Doho GH, Pistic J et coll.. (2006). Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *J Immunol*, **176**, 4, 2455-2464.

- 299- Moore AJ, Devine DA et Bibby MC. (1994). Preliminary experimental anticancer activity of cecropins. *Pept Res*, **7**, 5, 265-269.
- 300- Moskovitz J. (2005). Roles of methionine sulfoxide reductases in antioxidant defense, protein regulation and survival. *Curr Pharm Des*, **11**, 11, 1451-1457.
- 301- Müller CA, Markovic-Lipkovski J, Klatt T, Gamper J, Schwarz G, Beck H, Deeg M, Kalbacher H, Widmann S, Wessels JT et coll.. (2002). Human alpha-defensins HNPs-1, -2, and -3 in renal cell carcinoma: influences on tumor cell proliferation. *Am J Pathol*, **160**, 4, 1311-1324.
- 302- Muller L et Tougard C. (1995). Production and secretion of N-terminal secretogranin II derived peptides in GH3B6 prolactin cells. *Mol Cell Endocrinol*, **112**, 1, 101-112.
- 303- Muller L, Barret A, Picart R et Tougard C. (1997). Proteolytic processing of sulfated secretogranin II in the trans-Golgi network of GH3B6 prolactin cells. *J Biol Chem*, **272**, 6, 3669-3673.
- 304- Munoz DG. (1991). Chromogranin A-like immunoreactive neurites are major constituents of senile plaques. *Lab Invest*, **64**, 6, 826-832.
- 305- Murphy CJ, Foster BA, Mannis MJ, Selsted ME et Reid TW. (1993). Defensins are mitogenic for epithelial cells and fibroblasts. *J Cell Physiol*, **155**, 2, 408-413.
- 306- Mystkowska ET, Niemierko A, Komar A et Sawicki W. (2001). Embryotoxicity of magainin-2-amide and its enhancement by cyclodextrin, albumin, hydrogen peroxide and acidification. *Hum Reprod*, **16**, 7, 1457-1463.

N

- 307- Natori S et Huttner WB. (1996). Chromogranin B (secretogranin I) promotes sorting to the regulated secretory pathway of processing intermediates derived from a peptide hormone precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 9, 4431-4436.
- 308- Natori S, King A, Hellwig A, Weiss U, Iguchi H, Tsuchiya B, Kameya T, Takayanagi R, Nawata H et Huttner WB. (1998). Chromogranin B (secretogranin I), a neuroendocrine-regulated secretory protein, is sorted to exocrine secretory granules in transgenic mice. *EMBO J*, **17**, 12, 3277-3289.
- 309- Nicholas HB, Chan SS et Rosenquist GL. (1999). Reevaluation of the determinants of tyrosine sulfation. *Endocrine*, **11**, 3, 285-292.
- 310- Nicol L, McNeilly JR, Stridsberg M et McNeilly AS. (2004). Differential secretion of gonadotrophins: investigation of the role of secretogranin II and chromogranin

- A in the release of LH and FSH in LbetaT2 cells. *J Mol Endocrinol*, **32**, 2, 467-480.
- 311- Nicolas P et Mor A. (1995). Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense system of vertebrates. *Annu Rev Microbiol*, **49**, 1995, 277-304.
- 312- Niehrs C, Kraft M, Lee RW et Huttner WB. (1990). Analysis of the substrate specificity of tyrosylprotein sulfotransferase using synthetic peptides. *J Biol Chem*, **265**, 15, 8525-8532.
- 313- Nissen-Meyer J et Nes IF. (1997). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch Microbiol*, **167**, 2-3, 67-77.
- 314- Niyonsaba F, Someya A, Hirata M, Ogawa H et Nagaoka I. (2001). Evaluation of the effects of peptide antibiotics human beta-defensins-1/-2 and LL-37 on histamine release and prostaglandin D(2) production from mast cells. *Eur J Immunol*, **31**, 4, 1066-1075.
- 315- Niyonsaba F, Iwabuchi K, Matsuda H, Ogawa H et Nagaoka I. (2002a). Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase C-dependent pathway. *Int Immunol*, **14**, 4, 421-426.
- 316- Niyonsaba F, Iwabuchi K, Someya A, Hirata M, Matsuda H, Ogawa H et Nagaoka I. (2002b). A cathelicidin family of human antibacterial peptide LL-37 induces mast cell chemotaxis. *Immunology*, **106**, 1, 20-26.
- 317- Nolan JA, Trojanowski JQ et Hogue-Angeletti R. (1985). Neurons and neuroendocrine cells contain chromogranin: detection of the molecule in normal bovine tissues by immunochemical and immunohistochemical methods. *J Histochem Cytochem*, **33**, 8, 791-798.
- 318- Nomura I, Goleva E, Howell MD, Hamid QA, Ong PY, Hall CF, Darst MA, Gao B, Boguniewicz M, Travers JB et coll.. (2003). Cytokine milieu of atopic dermatitis, as compared to psoriasis, skin prevents induction of innate immune response genes. *J Immunol*, **171**, 6, 3262-3269.
- 319- Nonogaki K. (2000). New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia*, **43**, 5, 533-549.

O

- 320- O'Connor DT. (1983). Chromogranin: widespread immunoreactivity in polypeptide hormone producing tissues and in serum. *Regul Pept*, **6**, 3, 263-280.
- 321- O'Connor DT et Bernstein KN. (1984). Radioimmunoassay of chromogranin A in plasma as a measure of exocytotic sympathoadrenal activity in normal subjects and patients with pheochromocytoma. *N Engl J Med*, **311**, 12, 764-770.
- 322- O'Connor DT, Pandlan MR, Carlton E, Cervenka JH et Hsiao RJ. (1989). Rapid radioimmunoassay of circulating chromogranin A: in vitro stability, exploration of the neuroendocrine character of neoplasia, and assessment of the effects of organ failure. *Clin Chem*, **35**, 8, 1631-1637.
- 323- O'Connor DT, Cervenka JH, Stone RA, Parmer RJ, Franco-Bourland RE, Madrazo I et Langlais PJ. (1993). Chromogranin A immunoreactivity in human cerebrospinal fluid: properties, relationship to noradrenergic neuronal activity, and variation in neurologic disease. *Neuroscience*, **56**, 4, 999-1007.
- 324- O'Connor DT, Cadman PE, Smiley C, Salem RM, Rao F, Smith J, Funk SD, Mahata SK, Mahata M, Wen G et coll. (2005). Pancreastatin: multiple actions on human intermediary metabolism in vivo, variation in disease, and naturally occurring functional genetic polymorphism. *J Clin Endocrinol Metab*, **90**, 9, 5414-5425.
- 325- O'Farrell PH. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*, **250**, 10, 4007-4021.
- 326- Oberbeck R, Schmitz D, Wilsenack K, Schüler M, Pehle B, Schedlowski M et Exton MS. (2004). Adrenergic modulation of survival and cellular immune functions during polymicrobial sepsis. *Neuroimmunomodulation*, **11**, 4, 214-223.
- 327- Ohgami K, Ilieva IB, Shiratori K, Isogai E, Yoshida K, Kotake S, Nishida T, Mizuki N et Ohno S. (2003). Effect of human cationic antimicrobial protein 18 Peptide on endotoxin-induced uveitis in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **44**, 10, 4412-4418.
- 328- Ojcius DM et Young JD. (1991). Cytolytic pore-forming proteins and peptides: is there a common structural motif? *Trends Biochem Sci*, **16**, 6, 225-229.
- 329- Olson JK et Miller SD. (2004). Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol*, **173**, 6, 3916-3924.

- 330- Ong PY, Ohtake T, Brandt C, Strickland I, Boguniewicz M, Ganz T, Gallo RL et Leung DY. (2002). Endogenous antimicrobial peptides and skin infections in atopic dermatitis. *N Engl J Med*, **347**, 15, 1151-1160.
- 331- Ottiger HP, Battenberg EF, Tsou AP, Bloom FE et Sutcliffe JG. (1990). 1B1075: a brain- and pituitary-specific mRNA that encodes a novel chromogranin/secretogranin-like component of intracellular vesicles. *J Neurosci*, **10**, 9, 3135-3147.
- 332- Overdick B, Kirchmair R, Marksteiner J, Fischer-Colbrie R, Troger J, Winkler H et Saria A. (1996). Presence and distribution of a new neuropeptide, secretoneurin, in human retina. *Peptides*, **17**, 1, 1-4.

P

- 333- Papanicolaou DA, Tsigos C, Oldfield EH et Chrousos GP. (1996). Acute glucocorticoid deficiency is associated with plasma elevations of interleukin-6: does the latter participate in the symptomatology of the steroid withdrawal syndrome and adrenal insufficiency? *J Clin Endocrinol Metab*, **81**, 6, 2303-2306.
- 334- Pascual A. (2002). Pathogenesis of catheter-related infections: lessons for new designs. *Clin Microbiol Infect*, **8**, 5, 256-264.
- 335- Patrzykat A, Friedrich CL, Zhang L, Mendoza V et Hancock RE. (2002). Sublethal concentrations of pleurocidin-derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, **46**, 3, 605-614.
- 336- Payan-Carreira R, Rodrigues P et Carvalho PR. (2006). Chromogranin-A expression in the bovine testis. *Anim Reprod Sci*, **1**,, 0-1.
- 337- Peinado JR, Vazquez-Martinez R, Cruz-García D, Ruiz-Navarro A, Anouar Y, Tonon MC, Vaudry H, Gracia-Navarro F, Castano JP et Malagón MM. (2006). Differential expression and processing of chromogranin A and secretogranin II in relation to the secretory status of endocrine cells. *Endocrinology*, **147**, 3, 1408-1418.
- 338- Pinna LA. (1990). Casein kinase 2: an 'eminence grise' in cellular regulation? *Biochim Biophys Acta*, **1054**, 3, 267-284.
- 339- Portela-Gomes GM, Stridsberg M, Grimelius L, Falkmer UG et Falkmer S. (2004). Expression of chromogranins A, B, and C (secretogranin II) in human adrenal

- medulla and in benign and malignant pheochromocytomas. An immunohistochemical study with region-specific antibodies. *APMIS*, **112**, 10, 663-673.
- 340- Pouny Y, Rapaport D, Mor A, Nicolas P et Shai Y. (1992). Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry*, **31**, 49, 12416-12423.
- 341- Preece NE, Nguyen M, Mahata M, Mahata SK, Mahapatra NR, Tsigelny I et O'Connor DT. (2004). Conformational preferences and activities of peptides from the catecholamine release-inhibitory (catestatin) region of chromogranin A. *Regul Pept*, **118**, 1-2, 75-87.
- 342- Prommegger R, Ensinger C, Adlassnig C, Vaingankar S, Mahata SK, Marksteiner J et Margreiter R. (2004). Catestatin--a novel neuropeptide in carcinoid tumors of the appendix. *Anticancer Res*, **24**, 1, 311-316.
- 343- Pütsep K, Carlsson G, Boman HG et Andersson M. (2002). Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus Kostmann: an observation study. *Lancet*, **360**, 9340, 1144-1149.

R

- 344- Rangon CM, Haïk S, Faucheux BA, Metz-Boutigue MH, Fierville F, Fuchs JP, Hauw JJ et Aunis D. (2003). Different chromogranin immunoreactivity between prion and a-beta amyloid plaque. *Neuroreport*, **14**, 5, 755-758.
- 345- Reddy KV, Shahani SK et Meherji PK. (1996). Spermicidal activity of Magainins: in vitro and in vivo studies. *Contraception*, **53**, 4, 205-210.
- 346- Reddy VR et Manjramkar DD. (2000). Evaluation of the antifertility effect of magainin-A in rabbits: in vitro and in vivo studies. *Fertil Steril*, **73**, 2, 353-358.
- 347- Reinecke M, Höög A, Ostenson CG, Efendic S, Grimelius L et Falkmer S. (1991). Phylogenetic aspects of pancreastatin- and chromogranin-like immunoreactive cells in the gastro-entero-pancreatic neuroendocrine system of vertebrates. *Gen Comp Endocrinol*, **83**, 2, 167-182.
- 348- Reinecke M et Maake C. (1993). A phylogenetic survey of pancreastatin and chromogranin immunoreactivity in chromaffin (TH-, DBH-, and PNMT-immunoreactive) cells of the adrenal organ of vertebrates. *Gen Comp Endocrinol*, **90**, 2, 251-265.

- 349- Reinisch N, Kirchmair R, Kähler CM, Hogue-Angeletti R, Fischer-Colbrie R, Winkler H et Wiedermann CJ. (1993). Attraction of human monocytes by the neuropeptide secretoneurin. *FEBS Lett*, **334**, 1, 41-44.
- 350- Reissmann E, Ernsberger U, Francis-West PH, Rueger D, Brickell PM et Rohrer H. (1996). Involvement of bone morphogenetic protein-4 and bone morphogenetic protein-7 in the differentiation of the adrenergic phenotype in developing sympathetic neurons. *Development*, **122**, 7, 2079-2088.
- 351- Rieker S, Fischer-Colbrie R, Eiden L et Winkler H. (1988). Phylogenetic distribution of peptides related to chromogranins A and B. *J Neurochem*, **50**, 4, 1066-1073.
- 352- Rosa P et Zanini A. (1981). Characterization of adenohipophysial polypeptides by two-dimensional gel electrophoresis. II. Sulfated and glycosylated polypeptides. *Mol Cell Endocrinol*, **24**, 2, 181-193.
- 353- Rosa P, Hille A, Lee RW, Zanini A, De Camilli P et Huttner WB. (1985). Secretogranins I and II: two tyrosine-sulfated secretory proteins common to a variety of cells secreting peptides by the regulated pathway. *J Cell Biol*, **101**, 5 Pt 1, 1999-2011.
- 354- Rosenquist GL et Nicholas HB. (1993). Analysis of sequence requirements for protein tyrosine sulfation. *Protein Sci*, **2**, 2, 215-222.
- 355- Ross DJ, Cole AM, Yoshioka D, Park AK, Belperio JA, Laks H, Strieter RM, Lynch JP, Kubak B, Ardehali A et coll.. (2004). Increased bronchoalveolar lavage human beta-defensin type 2 in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplantation*, **78**, 8, 1222-1224.
- 356- Roumestand C, Louis V, Aumelas A, Grassy G, Calas B et Chavanieu A. (1998). Oligomerization of protegrin-1 in the presence of DPC micelles. A proton high-resolution NMR study. *FEBS Lett*, **421**, 3, 263-267.
- 357- Rupp ME et Archer GL. (1994). Coagulase-negative staphylococci: pathogens associated with medical progress. *Clin Infect Dis*, **19**, 2, 231-243.

S

- 358- Saiman L, Tabibi S, Starner TD, San Gabriel P, Winokur PL, Jia HP, McCray PB et Tack BF. (2001). Cathelicidin peptides inhibit multiply antibiotic-resistant pathogens from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**, 10, 2838-2844.

- 359- Salzet M. (2002a). Antimicrobial peptides are signaling molecules. *Trends Immunol*, **23**, 6, 283-284.
- 360- Salzet M et Verger-Bocquet M. (2002b). Cellular localization of a chromogranin B-like derived peptides in leeches. *Neuro Endocrinol Lett*, **23**, 3, 209-212.
- 361- Samia M, Larivière KE, Rochon MH, Hibbert BM, Basak A et Trudeau VL. (2004). Seasonal cyclicality of secretogranin-II expression and its modulation by sex steroids and GnRH in the female goldfish pituitary. *Gen Comp Endocrinol*, **139**, 3, 198-205.
- 362- Saria A, Troger J, Kirchmair R, Fischer-Colbrie R, Hogue-Angeletti R et Winkler H. (1993). Secretoneurin releases dopamine from rat striatal slices: a biological effect of a peptide derived from secretogranin II (chromogranin C). *Neuroscience*, **54**, 1, 1-4.
- 363- Saruta J, Tsukinoki K, Sasaguri K, Ishii H, Yasuda M, Osamura YR, Watanabe Y et Sato S. (2005). Expression and localization of chromogranin A gene and protein in human submandibular gland. *Cells Tissues Organs*, **180**, 4, 237-244.
- 364- Schimmel A, Bräunling O, Rütger U, Huttner WB et Gerdes HH. (1992). The organisation of the mouse secretogranin II gene. *FEBS Lett*, **314**, 3, 375-380.
- 365- Schwarz H, Villiger PM, von Kempis J et Lotz M. (1994). Neuropeptide Y is an inducible gene in the human immune system. *J Neuroimmunol*, **51**, 1, 53-61.
- 366- Scocchi M, Wang S et Zanetti M. (1997). Structural organization of the bovine cathelicidin gene family and identification of a novel member. *FEBS Lett*, **417**, 3, 311-315.
- 367- Scocchi M, Bontempo D, Boscolo S, Tomasinsig L, Giulotto E et Zanetti M. (1999). Novel cathelicidins in horse leukocytes(1). *FEBS Lett*, **457**, 3, 459-464.
- 368- Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D et Hancock RE. (2002). The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *J Immunol*, **169**, 7, 3883-3891.
- 369- Sechi S et Chait BT. (1998). Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification. *Anal Chem*, **70**, 24, 5150-5158.
- 370- Seidah NG, Hsi KL, De Serres G, Rochemont J, Hamelin J, Antakly T, Cantin M et Chrétien M. (1983). Isolation and NH₂-terminal sequence of a highly conserved human and porcine pituitary protein belonging to a new superfamily. Immunocytochemical localization in pars distalis and pars

- nervosa of the pituitary and in the supraoptic nucleus of the hypothalamus *Arch Biochem Biophys*, **225**, 2, 525-534.
- 371- Seidah NG, Hendy GN, Hamelin J, Paquin J, Lazure C, Metters KM, Rossier J et Chrétien M. (1987). Chromogranin A can act as a reversible processing enzyme inhibitor. Evidence from the inhibition of the IRCM-serine protease 1 cleavage of pro-enkephalin and ACTH at pairs of basic amino acids. *FEBS Lett*, **211**, 2, 144-150.
- 372- Seidah NG et Chrétien M. (1999). Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res*, **848**, 1-2, 45-62.
- 373- Sekiya K, Ghatei MA, Salahuddin MJ, Bishop AE, Hamid QA, Ibayashi H, Polak JM et Bloom SR. (1989). Production of GAWK (chromogranin-B 420-493)-like immunoreactivity by endocrine tumors and its possible diagnostic value. *J Clin Invest*, **83**, 6, 1834-1842.
- 374- Selsted ME, Tang YQ, Morris WL, McGuire PA, Novotny MJ, Smith W, Henschen AH et Cullor JS. (1993). Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J Biol Chem*, **268**, 9, 6641-6648.
- 375- Selsted ME et Ouellette AJ. (2005). Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol*, **6**, 6, 551-557.
- 376- Sen R et Sharp RR. (1980). The soluble components of chromaffin granules. A carbon-13 NMR survey. *Biochim Biophys Acta*, **630**, 3, 447-458.
- 377- Settleman J, Fonseca R, Nolan J et Angeletti RH. (1985). Relationship of multiple forms of chromogranin. *J Biol Chem*, **260**, 3, 1645-1651.
- 378- Shah NM, Groves AK et Anderson DJ. (1996). Alternative neural crest cell fates are instructively promoted by TGFbeta superfamily members. *Cell*, **85**, 3, 331-343.
- 379- Shai Y. (1995). Molecular recognition between membrane-spanning polypeptides. *Trends Biochem Sci*, **20**, 11, 460-464.
- 380- Shai Y. (1999). Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by alpha-helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides. *Biochim Biophys Acta*, **1462**, 1-2, 55-70.

- 381- Shi J, Ross CR, Chengappa MM et Blecha F. (1994). Identification of a proline-arginine-rich antibacterial peptide from neutrophils that is analogous to PR-39, an antibacterial peptide from the small intestine. *J Leukoc Biol*, **56**, 6, 807-811.
- 382- Shi J et Ganz T. (1998). The role of protegrins and other elastase-activated polypeptides in the bactericidal properties of porcine inflammatory fluids. *Infect Immun*, **66**, 8, 3611-3617.
- 383- Sigafos J, Chestnut WG, Merrill BM, Taylor LC, Diliberto EJ et Viveros OH. (1993). Novel peptides from adrenomedullary chromaffin vesicles. *J Anat*, **183 (Pt 2)**, 1993Oct, 253-264.
- 384- Simon JP et Aunis D. (1989). Biochemistry of the chromogranin A protein family. *Biochem J*, **262**, 1, 1-13.
- 385- Sinha S, Cheshenko N, Lehrer RI et Herold BC. (2003). NP-1, a rabbit alpha-defensin, prevents the entry and intercellular spread of herpes simplex virus type 2. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**, 2, 494-500.
- 386- Skerlavaj B, Benincasa M, Risso A, Zanetti M et Gennaro R. (1999). SMAP-29: a potent antibacterial and antifungal peptide from sheep leukocytes. *FEBS Lett*, **463**, 1-2, 58-62.
- 387- Skerlavaj B, Scocchi M, Gennaro R, Risso A et Zanetti M. (2001). Structural and functional analysis of horse cathelicidin peptides. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**, 3, 715-722.
- 388- Smith AD et Winkler H. (1967). Purification and properties of an acidic protein from chromaffin granules of bovine adrenal medulla. *Biochem J*, **103**, 2, 483-492.
- 389- Sobol RE, O'Connor DT, Addison J, Suchocki K, Royston I et Deftos LJ. (1986). Elevated serum chromogranin A concentrations in small-cell lung carcinoma. *Ann Intern Med*, **105**, 5, 698-700.
- 390- Somogyi P, Hodgson AJ, DePotter RW, Fischer-Colbrie R, Schober M, Winkler H et Chubb IW. (1984). Chromogranin immunoreactivity in the central nervous system. Immunochemical characterisation, distribution and relationship to catecholamine and enkephalin pathways. *Brain Res*, **320**, 2-3, 193-230.
- 391- Song H, Peng Y, Huang Q, Dai M, Mao Y, Zhang Q, Mao M, Fu G, Luo M, Chen J et coll.. (1998). Human secretogranin III mRNA, complete cds. *EMBL/GenBank/DDBJ databases*, **1**,, 1-5.

- 392- Song KS, Park YS, Choi JR, Kim HK et Park Q. (1999). A molecular model of a point mutation (Val297Met) in the serine protease domain of protein C. *Exp Mol Med*, **31**, 1, 47-51.
- 393- Soszynski D, Metz-Boutigue MH, Aunis D et Bader MF. (1993). Secretogranin II: regulation of synthesis and post-translational proteolysis in bovine adrenal chromaffin cells. *J Neuroendocrinol*, **5**, 6, 655-662.
- 394- Speicher KD, Olbas O, Harper S et Speicher DW. (2000). Systematic analysis of peptide recoveries from in-gel digestions for protein identifications in proteome studies *J Biomol Tech*, **11**, 74-86.
- 395- Stark M, Danielsson O, Griffiths WJ, Jörnvall H et Johansson J. (2001). Peptide repertoire of human cerebrospinal fluid: novel proteolytic fragments of neuroendocrine proteins. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **754**, 2, 357-367.
- 396- Steiner HJ, Schmid KW, Fischer-Colbrie R, Sperk G et Winkler H. (1989). Co-localization of chromogranin A and B, secretogranin II and neuropeptide Y in chromaffin granules of rat adrenal medulla studied by electron microscopic immunocytochemistry. *Histochemistry*, **91**, 6, 473-477.
- 397- Sternberg EM. (2006). Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol*, **6**, 4, 318-328.
- 398- Stewart PS et Costerton JW. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*, **358**, 9276, 135-138.
- 399- Stickler D et McLean R. (1995). Biomaterials associated infections: the scale of the problem. *Cells Materials*, **5**, 167-182.
- 400- Straub RH, Mayer M, Kreutz M, Leeb S, Schölmerich J et Falk W. (2000a). Neurotransmitters of the sympathetic nerve terminal are powerful chemoattractants for monocytes. *J Leukoc Biol*, **67**, 4, 553-558.
- 401- Straub RH, Schaller T, Miller LE, von Hörsten S, Jessop DS, Falk W et Schölmerich J. (2000b). Neuropeptide Y cotransmission with norepinephrine in the sympathetic nerve-macrophage interplay. *J Neurochem*, **75**, 6, 2464-2471.
- 402- Stridsberg M, Oberg K, Li Q, Engström U et Lundqvist G. (1995). Measurements of chromogranin A, chromogranin B (secretogranin I), chromogranin C (secretogranin II) and pancreastatin in plasma and urine from patients with carcinoid tumours and endocrine pancreatic tumours. *J Endocrinol*, **144**, 1, 49-59.

- 403- Stridsberg M et Husebye ES. (1997). Chromogranin A and chromogranin B are sensitive circulating markers for pheochromocytoma. *Eur J Endocrinol*, **136**, 1, 67-73.
- 404- Strub JM, Garcia-Sablone P, Lonning K, Taupenot L, Hubert P, Van Dorsselaer A, Aunis D et Metz-Boutigue MH. (1995). Processing of chromogranin B in bovine adrenal medulla. Identification of secretolytin, the endogenous C-terminal fragment of residues 614-626 with antibacterial activity. *Eur J Biochem*, **229**, 2, 356-368.
- 405- Strub JM, Goumon Y, Lugardon K, Capon C, Lopez M, Moniatte M, Van Dorsselaer A, Aunis D et Metz-Boutigue MH. (1996a). Antibacterial activity of glycosylated and phosphorylated chromogranin A-derived peptide 173-194 from bovine adrenal medullary chromaffin granules. *J Biol Chem*, **271**, 45, 28533-28540.
- 406- Strub JM, Hubert P, Nullans G, Aunis D et Metz-Boutigue MH. (1996b). Antibacterial activity of secretolytin, a chromogranin B-derived peptide (614-626), is correlated with peptide structure. *FEBS Lett*, **379**, 3, 273-278.
- 407- Strub JM, Sorokine O, Van Dorsselaer A, Aunis D et Metz-Boutigue MH. (1997). Phosphorylation and O-glycosylation sites of bovine chromogranin A from adrenal medullary chromaffin granules and their relationship with biological activities. *J Biol Chem*, **272**, 18, 11928-11936.

T

- 408- Tasiemski A, Hammad H, Vandenbulcke F, Breton C, Bilfinger TJ, Pestel J et Salzet M. (2002). Presence of chromogranin-derived antimicrobial peptides in plasma during coronary artery bypass surgery and evidence of an immune origin of these peptides. *Blood*, **100**, 2, 553-559.
- 409- Tatemoto K, Efendić S, Mutt V, Makk G, Feistner GJ et Barchas JD. (1986). Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature*, **324**, 6096, 476-478.
- 410- Taupenot L, Ciesielski-Treska J, Ulrich G, Chasserot-Golaz S, Aunis D et Bader MF. (1996). Chromogranin A triggers a phenotypic transformation and the generation of nitric oxide in brain microglial cells. *Neuroscience*, **72**, 2, 377-389.

- 411- Territo MC, Ganz T, Selsted ME et Lehrer R. (1989). Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J Clin Invest*, **84**, 6, 2017-2020.
- 412- Tischler AS. (2002). Chromaffin cells as models of endocrine cells and neurons. *Ann N Y Acad Sci*, **971**, 2002Oct, 366-370.
- 413- Tjabringa GS, Aarbiou J, Ninaber DK, Drijfhout JW, Sørensen OE, Borregaard N, Rabe KF et Hiemstra PS. (2003). The antimicrobial peptide LL-37 activates innate immunity at the airway epithelial surface by transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Immunol*, **171**, 12, 6690-6696.
- 414- Tomasinsig L et Zanetti M. (2005). The cathelicidins--structure, function and evolution. *Curr Protein Pept Sci*, **6**, 1, 23-34.
- 415- Tossi A, Sandri L et Giangaspero A. (2000). Amphipathic, alpha-helical antimicrobial peptides. *Biopolymers*, **55**, 1, 4-30.
- 416- Towbin H, Staehelin T et Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 9, 4350-4354.
- 417- Travis SM, Anderson NN, Forsyth WR, Espiritu C, Conway BD, Greenberg EP, McCray PB, Lehrer RI, Welsh MJ et Tack BF. (2000). Bactericidal activity of mammalian cathelicidin-derived peptides. *Infect Immun*, **68**, 5, 2748-2755.
- 418- Troger J, Doblinger A, Leierer J, Laslop A, Schmid E, Teuchner B, Opatril M, Philipp W, Klimaschewski L, Pfaller K et coll.. (2005). Secretoneurin in the peripheral ocular innervation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **46**, 2, 647-654.
- 419- Twig G, Graf SA, Messerli MA, Smith PJ, Yoo SH et Shirihai OS. (2005). Synergistic amplification of beta-amyloid- and interferon-gamma-induced microglial neurotoxic response by the senile plaque component chromogranin A. *Am J Physiol Cell Physiol*, **288**, 1, C169-175.

U

- 420- Ulrich G, Ciesielski-Treska J, Taupenot L et Bader MF. (2002). Chromogranin A-activated microglial cells induce neuronal apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*, **971**, 2002Oct, 560-562.
- 421- Urushitani M, Sik A, Sakurai T, Nukina N, Takahashi R et Julien JP. (2006). Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci*, **9**, 1, 108-118.

- 422- Uzzell T, Stolzenberg ED, Shinnar AE et Zasloff M. (2003). Hagfish intestinal antimicrobial peptides are ancient cathelicidins. *Peptides*, **24**, 11, 1655-1667.

V

- 423- Vallet VS, Li JY et Duval J. (1997). Secretogranin II (SgII) distribution and processing studies in human normal and adenomatous anterior pituitaries using new polyclonal antibodies. *Regul Pept*, **68**, 3, 155-163.
- 424- Van der Poll T, Jansen J, Endert E, Sauerwein HP et van Deventer SJ. (1994). Noradrenaline inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin 6 production in human whole blood. *Infect Immun*, **62**, 5, 2046-2050.
- 425- Van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W et Zehnder AJ. (1990). Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiol Rev*, **54**, 1, 75-87.
- 426- Vaudry H et Conlon JM. (1991). Identification of a peptide arising from the specific post-translation processing of secretogranin II. *FEBS Lett*, **284**, 1, 31-33.
- 427- Videen JS, Mezger MS, Chang YM et O'Connor DT. (1992). Calcium and catecholamine interactions with adrenal chromogranins. Comparison of driving forces in binding and aggregation. *J Biol Chem*, **267**, 5, 3066-3073.
- 428- Vieau D, Rojas-Miranda A, Verley JM, Lenne F et Bertagna X. (1991). The secretory granule peptides 7B2 and CCB are sensitive biochemical markers of neuroendocrine bronchial tumours in man. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **35**, 4, 319-325.
- 429- Vora P, Youdim A, Thomas LS, Fukata M, Tesfay SY, Lukasek K, Michelsen KS, Wada A, Hirayama T, Arditi M et coll.. (2004). Beta-defensin-2 expression is regulated by TLR signaling in intestinal epithelial cells. *J Immunol*, **173**, 9, 5398-5405.

W

- 430- Waldbieser GC, Aimi J et Dixon JE. (1991). Cloning and characterization of the rat complementary deoxyribonucleic acid and gene encoding the neuroendocrine peptide 7B2. *Endocrinology*, **128**, 6, 3228-3236.
- 431- Wallukat G. (2002). The beta-adrenergic receptors. *Herz*, **27**, 7, 683-690.
- 432- Wang X, Zhang Z, Louboutin JP, Moser C, Weiner DJ et Wilson JM. (2003). Airway epithelia regulate expression of human beta-defensin 2 through Toll-like receptor 2. *FASEB J*, **17**, 12, 1727-1729.

- 433- Wang Z, Vandenberghe I, Depreitere J, Devreese B, Clerens S, Nouwen EJ, Van Beeumen J et De Potter W. (2001). Identification and characterization of novel chromogranin B-derived peptides from porcine chromaffin granules by liquid chromatography/electrospray tandem MS. *Eur J Biochem*, **268**, 2, 235-242.
- 434- Wassenberg JJ et Martin TF. (2002). Role of CAPS in dense-core vesicle exocytosis. *Ann N Y Acad Sci*, **971**, 2002Oct, 201-209.
- 435- Watkins LR et Maier SF. (1999). Implications of immune-to-brain communication for sickness and pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 14, 7710-7713.
- 436- Watkinson A et Dockray GJ. (1992). Functional control of chromogranin A and B concentrations in the body of the rat stomach. *Regul Pept*, **40**, 1, 51-61.
- 437- Weiler R, Cidon S, Gershon MD, Tamir H, Hogue-Angeletti R et Winkler H. (1989). Adrenal chromaffin granules and secretory granules from thyroid parafollicular cells have several common antigens. *FEBS Lett*, **257**, 2, 457-459.
- 438- Weiss U, Ischia R, Eder S, Lovisetti-Scamihorn P, Bauer R et Fischer-Colbrie R. (2000). Neuroendocrine secretory protein 55 (NESP55): alternative splicing onto transcripts of the GNAS gene and posttranslational processing of a maternally expressed protein. *Neuroendocrinology*, **71**, 3, 177-186.
- 439- Westermann R, Stögbauer F, Unsicker K et Lietzke R. (1988). Calcium-dependence of chromogranin A-catecholamine interaction. *FEBS Lett*, **239**, 2, 203-206.
- 440- Wirth HP, Eberle C, Meyenberger C, Bertschinger P, Häcki WH, Ammann R et Heitz PU. (1994). [Gastrointestinal hormone profile in medullary thyroid carcinoma] *Schweiz Med Wochenschr*, **124**, 21, 906-911.
- 441- Wohlers TM et Fridovich-Keil JL. (2000). Studies of the V94M-substituted human UDPgalactose-4-epimerase enzyme associated with generalized epimerase-deficiency galactosaemia. *J Inherit Metab Dis*, **23**, 7, 713-729.
- 442- Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, Eberhardt B, Platzer C, Schöning B, Glöckner F, Lanksch WR, Volk HD et Döcke WD. (1998). Sympathetic activation triggers systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. *Nat Med*, **4**, 7, 808-813.
- 443- Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K et Sabat R. (2004). IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity*, **21**, 2, 241-254.
- 444- Woltman AM, Massacrier C, de Fijter JW, Caux C et van Kooten C. (2002). Corticosteroids prevent generation of CD34+-derived dermal dendritic cells

- but do not inhibit Langerhans cell development. *J Immunol*, **168**, 12, 6181-6188.
- 445- Wong JH et Ng TB. (2006). Limenin, a defensin-like peptide with multiple exploitable activities from shelf beans. *J Pept Sci*, **12**, 5, 341-346.
- 446- Woodgett JR, Gould KL et Hunter T. (1986). Substrate specificity of protein kinase C. Use of synthetic peptides corresponding to physiological sites as probes for substrate recognition requirements. *Eur J Biochem*, **161**, 1, 177-184.
- 447- Wu HJ, Rozansky DJ, Parmer RJ, Gill BM et O'Connor DT. (1991). Structure and function of the chromogranin A gene. Clues to evolution and tissue-specific expression. *J Biol Chem*, **266**, 20, 13130-13134.

Y

- 448- Yajima A, Ikeda M, Miyazaki K, Maeshima T, Narita N et Narita M. (2004). Manserin, a novel peptide from secretogranin II in the neuroendocrine system. *Neuroreport*, **15**, 11, 1755-1759.
- 449- Yanagihara N, Oishi Y, Yamamoto H, Tsutsui M, Kondoh J, Sugiura T, Miyamoto E et Izumi F. (1996). Phosphorylation of chromogranin A and catecholamine secretion stimulated by elevation of intracellular Ca²⁺ in cultured bovine adrenal medullary cells. *J Biol Chem*, **271**, 29, 17463-17468.
- 450- Yang D, Chen Q, Chertov O et Oppenheim JJ. (2000). Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J Leukoc Biol*, **68**, 1, 9-14.
- 451- Yang D, Biragyn A, Kwak LW et Oppenheim JJ. (2002). Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol*, **23**, 6, 291-296.
- 452- Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J et Oppenheim JJ. (2004). Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol*, **22**, 2004, 181-215.
- 453- Yasuda D, Iguchi H, Funakoshi A, Wakasugi H, Sekiya K, Misawa T, Tateishi K, Bloom SR et Nawata H. (1993). Comparison of plasma pancreastatin and GAWK concentrations, presumed processing products of chromogranin A and B, in plasma of patients with pancreatic islet cell tumors. *Horm Metab Res*, **25**, 11, 593-595.

- 454- Yasuhara O, Kawamata T, Aimi Y, McGeer EG et McGeer PL. (1994). Two types of dystrophic neurites in senile plaques of Alzheimer disease and elderly non-demented cases. *Neurosci Lett*, **171**, 1-2, 73-76.
- 455- Yates JR. (1998). Mass spectrometry and the age of the proteome. *J Mass Spectrom*, **33**, 1, 1-19.
- 456- Yoo SH et Albanesi JP. (1990). Ca²⁺(+)-induced conformational change and aggregation of chromogranin A. *J Biol Chem*, **265**, 24, 14414-14421.
- 457- Yoo SH. (1994). pH-dependent interaction of chromogranin A with integral membrane proteins of secretory vesicle including 260-kDa protein reactive to inositol 1,4,5-trisphosphate receptor antibody. *J Biol Chem*, **269**, 16, 12001-12006.
- 458- Yoo SH et Lewis MS. (1995). Thermodynamic study of the pH-dependent interaction of chromogranin A with an intraluminal loop peptide of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *Biochemistry*, **34**, 2, 632-638.
- 459- Yoo SH et Jeon CJ. (2000a). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ channel modulatory role of chromogranin A, a Ca²⁺ storage protein of secretory granules. *J Biol Chem*, **275**, 20, 15067-15073.
- 460- Yoo SH, So SH, Kweon HS, Lee JS, Kang MK et Jeon CJ. (2000b). Coupling of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and chromogranins A and B in secretory granules. *J Biol Chem*, **275**, 17, 12553-12559.
- 461- Yoo SH, Oh YS, Kang MK, Huh YH, So SH, Park HS et Park HY. (2001). Localization of three types of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ channel in the secretory granules and coupling with the Ca²⁺ storage proteins chromogranins A and B. *J Biol Chem*, **276**, 49, 45806-45812.
- 462- Yoo SH, You SH, Kang MK, Huh YH et Shim CS. (2002a). Localization of secretory granule marker protein chromogranin B in the nucleus. *Ann N Y Acad Sci*, **971**, 2002Oct, 345-348.
- 463- Yoo SH, You SH, Kang MK, Huh YH, Lee CS et Shim CS. (2002b). Localization of the secretory granule marker protein chromogranin B in the nucleus. Potential role in transcription control. *J Biol Chem*, **277**, 18, 16011-16021.
- 464- Yoo SH, Nam SW, Huh SK, Park SY et Huh YH. (2005a). Presence of a nucleoplasmic complex composed of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺ channel, chromogranin B, and phospholipids. *Biochemistry*, **44**, 25, 9246-9254.

- 465- Yoo SH, You SH et Huh YH. (2005b). Presence of syntaxin 1A in secretory granules of chromaffin cells and interaction with chromogranins A and B. *FEBS Lett*, **579**, 1, 222-228.
- 466- Yoshie S, Hagn C, Ehrhart M, Fischer-Colbrie R, Grube D, Winkler H et Gratzl M. (1987). Immunological characterization of chromogranins A and B and secretogranin II in the bovine pancreatic islet. *Histochemistry*, **87**, 2, 99-106.
- 467- Yount NY, Yuan J, Tarver A, Castro T, Diamond G, Tran PA, Levy JN, McCullough C, Cullor JS, Bevins CL et coll.. (1999). Cloning and expression of bovine neutrophil beta-defensins. Biosynthetic profile during neutrophilic maturation and localization of mature peptide to novel cytoplasmic dense granules. *J Biol Chem*, **274**, 37, 26249-26258.

Z

- 468- Zanetti M, Storici P, Tossi A, Scocchi M et Gennaro R. (1994). Molecular cloning and chemical synthesis of a novel antibacterial peptide derived from pig myeloid cells. *J Biol Chem*, **269**, 11, 7855-7858.
- 469- Zanetti M, Gennaro R et Romeo D. (1995). Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett*, **374**, 1, 1-5.
- 470- Zanini A et Rosa P. (1981). Characterization of adenohipophysial polypeptides by two-dimensional gel electrophoresis. I. L-[3H]leucine-labeled polypeptides. *Mol Cell Endocrinol*, **24**, 2, 165-179.
- 471- Zasloff M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, **415**, 6870, 389-395.
- 472- Zhang B, Tan Z, Zhang C, Shi Y, Lin Z, Gu N, Feng G et He L. (2002). Polymorphisms of chromogranin B gene associated with schizophrenia in Chinese Han population. *Neurosci Lett*, **323**, 3, 229-233.
- 473- Zhang G, Ross CR et Blecha F. (2000). Porcine antimicrobial peptides: new prospects for ancient molecules of host defense. *Vet Res*, **31**, 3, 277-296.
- 474- Zhang L, Scott MG, Yan H, Mayer LD et Hancock RE. (2000). Interaction of polyphemusin I and structural analogs with bacterial membranes, lipopolysaccharide, and lipid monolayers. *Biochemistry*, **39**, 47, 14504-14514.

-
- 475- Zhang L, Yu W, He T, Yu J, Caffrey RE, Dalmaso EA, Fu S, Pham T, Mei J, Ho JJ et coll.. (2002). Contribution of human alpha-defensin 1, 2, and 3 to the anti-HIV-1 activity of CD8 antiviral factor. *Science*, **298**, 5595, 995-1000.
- 476- Zhang L et Falla TJ. (2004). Cationic antimicrobial peptides - an update. *Expert Opin Investig Drugs*, **13**, 2, 97-106.
- 477- Zhang X, Dillen L, Bauer SH, Van Dongen W, Liang F, Przybylski M, Esmans E, De Potter WP et Claeys M. (1997). Mass spectrometric identification of phosphorylated vasostatin II, a chromogranin A-derived protein fragment (1-113). *Biochim Biophys Acta*, **1343**, 2, 287-298.
- 478- Zhao C, Ganz T et Lehrer RI. (1995). Structures of genes for two cathelin-associated antimicrobial peptides: prophenin-2 and PR-39. *FEBS Lett*, **376**, 3, 130-134.
- 479- Zhao E, Basak A, Crump K et Trudeau VL. (2006). Proteolytic processing and differential distribution of secretogranin-II in goldfish. *Gen Comp Endocrinol*, **146**, 2, 100-107.

Liste des publications

- Mason AJ, **Gasnier C**, Kichler A, Prévost G, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Bechinger B. Enhanced membrane disruption and antibiotic action against pathogenic bacteria by designed histidine-rich peptides at acidic pH. (*Soumis*).
- Goumon Y, Muller A, Glattard E, Marban C, **Gasnier C**, Strub JM, Chasserot-Golaz S, Rohr O, Stefano GB, Welters ID, Van Dorsselaer A, Schoentgen F, Aunis D, Metz-Boutigue MH. Identification of morphine-6-glucuronide in chromaffin cell secretory granules. *J Biol Chem*. 2006 Mar 24 ; 281(**12**) : 8082-9. 2006 Jan 24.
- Etienne O, **Gasnier C**, Taddei C, Voegel JC, Aunis D, Schaaf P, Metz-Boutigue MH, Bolcato-Bellemin AL, Egles C. Antifungal coating by biofunctionalized polyelectrolyte multilayered films. *Biomaterials*. 2005 Nov ; 26(**33**) : 6704-12.
- **Gasnier C**, Lugardon K, Ruh O, Strub JM, Aunis D, Metz-Boutigue MH. Characterization and location of post-translational modifications on chromogranin B from bovine adrenal medullary chromaffin granules. *Proteomics*. 2004 Jun ; 4(**6**) : 1789-801.
- Kieffer AE, Goumon Y, Ruh O, Chasserot-Golaz S, Nullans G, **Gasnier C**, Aunis D, Metz-Boutigue MH. The N- and C-terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities. *FASEB J*. 2003 Apr ; 17(**6**) : 776-8.

Enhanced membrane disruption and antibiotic action against pathogenic bacteria by designed histidine-rich peptides at acidic pH

A. James Mason*[†], Claire Gasnier[‡], Antoine Kichler[§], Gilles Prévost[¶], Dominique Aunis[‡], Marie-Hélène Metz-Boutigue[‡] and Burkhard Bechinger[†]

[†]Faculté de chimie, University Louis Pasteur / CNRS LC3-UMR7177, Institut le Bel, 4 rue Blaise Pascal, F-67070 Strasbourg, France; [‡]INSERM Unité 575, Physiopathologie du Système Nerveux, 5 rue Blaise Pascal, F-67084 Strasbourg, France; [§]Généthon-CNRS UMR8115, 1 rue de l'Internationale, BP60, F-91002 Evry, France and [¶]UPRES EA-3432 Institut de Bactériologie ULP-HUS, 3 rue Koeberlé F-67000 Strasbourg, France

jmason@chimie.u-strasbg.fr

Corresponding Author*: Institut Isis, 8 rue Gaspard Monge, 67083 Strasbourg, France

ABSTRACT: The histidine rich amphipathic cationic peptide LAH4 has antibiotic and DNA delivery capabilities. Here we explore the interaction of peptides from this family with model membranes as monitored by solid-state ²H NMR and the antibiotic activity against a range of bacteria. At neutral pH the membrane disruption is weak but at acidic pH the peptides strongly disturb the anionic lipid component of bacterial membranes and cause bacterial lysis. The peptides are effective antibiotics at both pH 7.2 and pH 5.5 although the antibacterial activity is strongly affected by the change in pH. At neutral pH the LAH peptides were active against both methicillin resistant and sensitive *Staphylococcus aureus* (MRSA/MSSA) strains but ineffective against *Pseudomonas aeruginosa*. In contrast, the LAH peptides were highly active against *P. aeruginosa* in an acidic environment, as is found in the epithelial lining fluid of cystic fibrosis patients. Our results show that modest antibiotic activity of histidine rich peptides can be dramatically enhanced by inducing membrane disruption, in this case by lowering the pH, and that histidine rich peptides have potential as future antibiotic agents.

INTRODUCTION

With the dramatic rise of antibiotic resistance in pathogenic bacteria, there is no doubt that there is an urgent requirement for the development of novel antibiotics. The lungs of cystic fibrosis patients are chronically infected by lineages of *Pseudomonas aeruginosa* with high mutation rates that can readily become resistant to current antibiotics (25, 20) whilst the impact of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) has been well recorded (2). These bacteria therefore represent significant targets for new classes of antibiotics.

Cationic antimicrobial peptides play a central role in preventing the onset of infection in many organisms and, following the introduction of a number of such peptides in clinical trials (16), it seems likely that development of these peptides will provide the basis for such a new class of antibiotics. LAH4, a histidine rich amphipathic α -helical peptide (4) has been shown to possess both antibiotic (34) and DNA delivery capabilities (17, 18). This dual functionality could be exploited in a therapeutic strategy for a number of diseases, a notable example being cystic fibrosis, where LAH4 or a derivative thereof could form part of a gene delivery vehicle whilst concomitantly fighting microbial infections that result from the underlying condition. Therefore a fundamental understanding of the antibiotic strategies employed by cationic antimicrobial peptides such as LAH4 will aid design of more powerful antibiotics that may eventually become frontline treatments for a variety of infectious diseases.

To understand in greater detail how histidine rich peptides operate against their microbial targets, we synthesised a series of derivatives of LAH4 and combined biophysical studies of their interactions with model membranes by solid-state NMR of chain deuterated lipids with *in vitro* observations of their properties against a variety of pathogenic bacterial targets. The original design of LAH4 (4) was inspired by the antibiotic peptide magainin, isolated from *Xenopus laevis* (37), which is thought to exert most of its bactericidal effects through disruption of the cell membrane (38, 7). In contrast, a number of cationic antimicrobial peptides, whilst also disrupting bacterial membranes, have been shown to operate through intracellular modes of killing such as binding nucleic acids (26, 36) or

inhibiting nucleic acid or protein synthesis (27, 10, 32).

Here we show that LAH4 derivatives do display antibiotic activity at neutral pH but do not strongly disrupt model membranes nor do they have a bacteriolytic effect on *Escherichia coli* or *Bacillus megaterium* even at concentrations well above the determined minimum inhibitory concentrations (MIC). At acidic pH however, where the antibiotic activity of the peptides is enhanced and a bacteriolytic effect is observed at and above the MIC, the peptide adopts an in-plane orientation in the membrane and destabilises the anionic lipid component of model membranes. The LAH peptides show activity against a variety of pathogenic strains of *S. aureus* at neutral pH. Furthermore, the LAH peptides though ineffective against *P. aeruginosa* at neutral pH, are highly active at acidic pH. These results indicate that these histidine rich cationic peptides can operate with at least two distinct modes of bacterial killing and have the potential to be developed into effective antimicrobial agents.

MATERIALS AND METHODS

Peptide and Lipids. The peptides (Table 1) were synthesized using standard Fmoc solid-state chemistry (24) on a Millipore 9050 synthesiser. In crude peptide preparations a predominant peak was observed when analysed by HPLC with acetonitrile/water gradients. During HPLC purification the main peak was collected and the identity of the product confirmed by matrix assisted laser desorption ionisation (MALDI) mass spectrometry where a single molecular ion peak was observed in addition to the monosodium and monopotassium peaks. The purity of the crude peptides were estimated to be approximately 80% whilst the purified peptides were >95% pure. The lipids 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*21 glycerol-3-phosphatidylethanolamine (POPE), 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol-3-phosphatidylglycerol (POPG), 1-palmitoyld31-2-oleoyl-*sn*-glycerol-3-phosphatidylethanolamine (POPE-d31) and 1-palmitoyld31-2-oleoyl-*sn*-glycerol-3-phosphatidylglycerol (POPG-d31) were obtained from Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, AL) and used without further purification. All other reagents were analytical grade or better.

Antibacterial assays. The following strains were tested: *Bacillus megaterium* (MA), *Escherichia coli* (D22 and ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (NCIM 2079, S2070, S5751, S121, S4820). The antibacterial activities of the peptides were tested at two different pH conditions (7.2 and 5.5), using a Mueller-Hinton Broth medium (Difco laboratories). Bacteria were first grown aerobically with vigorous shaking at 37°C in the appropriate medium and aqueous peptide solutions (10 µl) were incubated in a 96-well microplate with 100 µl of a mid7 logarithmic-phase culture of bacteria with a calculated starting OD_{620 nm} of 0.001. Microbial growth was assessed by the increase of OD_{620 nm} after 18 h incubation at 37°C and the value of control cultures growing without peptide was taken as 100%. Each assay was performed in triplicate and the antibacterial activity is evaluated with the Minimal Inhibitory Concentration inhibiting 50% or 100% of bacterial growth (MIC₅₀ or MIC₁₀₀). In order to determine whether bacterial lysis was implicated in the bacterial growth inhibition mechanism, 1 ml of a mid-logarithmic-phase culture of bacteria with a starting OD_{600 nm} of 0.4 (pH 7.2) or 0.2 (pH 5.5) was incubated with peptide according to the usual experimental conditions and OD_{600 nm} was measured after 10 min (T₀) and 2 hours (T₁). Statistical analysis was by ANOVA (20) with Bonferonni post-hoc *t*-test, one tailed. After 2 h, bacterial culture medium was diluted (10 µl/1 ml of Mueller-Hinton Broth medium) and serial 10-fold dilutions were prepared and spread out on Mueller-Hinton agar. For each experiment, after 18 h, the colonies were counted.

Sample Preparation for Solid-state NMR. Samples with different lipid compositions were prepared for 2H-echo NMR; POPE/POPE-d31/POPG and POPE/POPG-d31 with respective molar ratios of 2:1:1 and 3:1. A total of around 5 mg lipids per sample were dissolved and mixed in chloroform and dried under rotor-evaporation at room temperature. The lipid films were exposed to vacuum overnight and were then rehydrated with 5 ml of a suspension of LAH peptide in 0.1 M Tris, 0.1 M KCl buffer at pH 7.5 at room temperature to give a final concentration of 2.5% by mole relative to the lipids. The samples were briefly sonicated in a bath sonicator and subjected to five rapid freeze-thaw cycles and then centrifuged at 21000g for 20 min at room temperature. Previous determination of a binding

constant of 4.2×10^3 (34) for LAH4 and PC vesicles at pH 7.5 indicates that very little peptide will be free in solution after this process. The pellets, containing lipid vesicles and associated LAH peptides were transferred to Bruker 4 mm MAS rotors for NMR measurements. Lipid vesicles were also prepared in this way in the absence of peptide. After solid-state NMR measurements were recorded on these samples at pH 7.5 the pellets were resuspended in a large excess of buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M KCl) at pH 5. The samples were then sonicated as above for 5 minutes and again centrifuged and loaded into MAS rotors for further NMR measurements.

Solid-state NMR. ²H quadrupole experiments (13) for samples containing POPG-d31 or POPE-d31 were performed at 46.10 MHz on a Bruker Avance 300 NMR spectrometer using a 4 mm MAS probe, spectral width of 200 KHz and with recycle delay, echo delay, acquisition time and 90° pulse lengths of 0.3 s, 42 µs, 2 ms and 5 µs respectively. The temperature was maintained at 298 K. Between 50,000 and 200,000 transients were acquired to obtain a signal to noise ratio greater than 50:1. During processing the first 40 points were removed in order to start Fourier-transformation at the beginning of the echo. Spectra were zero filled to 8k points and 50 Hz exponential line-broadening was applied. Smoothed deuterium order parameter profiles were obtained from symmetrised and dePaked 2H-NMR powder spectra using published procedures (29, 30, 31).

RESULTS

Antibacterial assays – *E. coli* / *B. megaterium*. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) inhibiting 50% of bacterial growth for the Gram negative bacterium *E. coli* and the Gram positive bacterium *B. megaterium* are shown for a range of LAH4 isomers and derivatives and magainin (Table 1), a peptide derived from *Xenopus laevis* (37) with well characterised antibiotic activity (39).

The series of LAH4 isomers display antibiotic activity against both *E. coli* and *B. megaterium* at neutral pH, with a MIC of 5 µM, and are all more effective than magainin 2. There are practically no differences in antibiotic activity between the LAH4 isomers at either neutral or acidic pH, indicating that positioning of the histidine residues does not significantly influence antimicrobial activity¹. Increasing the number of

histidine residues in the peptide sequence enhances slightly the antibiotic activity at neutral pH (Table 1). In contrast, the addition of phenylalanine residues into the sequence (LAH4-L1-F4) noticeably reduces the antibiotic activity of the peptide thereby reaching the level observed for magainin 2 which is also rich in phenylalanine. When the pH in the growth medium is lowered to 5.5, the activity of the peptides against both test bacteria is enhanced (Table 1) indeed for the LAH4 isomers, a peptide concentration as low as 0.5 μM has an inhibitory effect against *E. coli*.

To gain some understanding of the mechanism of antibacterial action of the LAH peptides, two assays were performed to determine whether the peptides were bactericidal or bacteriostatic and if bactericidal, whether the cell membrane is disrupted. After an initial period of growth of the two test bacterial strains, peptide was added at a concentration corresponding to the MIC50, the MIC100 and two times the MIC100. Four peptides were selected for this comparative study; LAH4-L1, LAH6-L1 and the original LAH4 were compared with magainin 2 at both neutral and acidic pH (Fig. 1). Examples are shown for the action of LAH6-L1 on *B. megaterium* (Fig. 1A) and LAH4 and magainin 2 on *E. coli* (Fig. 1B/C). At acidic pH when the histidine peptides are charged the LAH peptides are expected to adopt an orientation, like magainin 2 (9), parallel to the membrane surface (4, 1). As seen for LAH4 and LAH6-L1 (Fig. 1A/B), under these conditions the optical densities of the cultures were dramatically reduced after 2 hours incubation (T1) by the addition of the peptides at their effective antibacterial concentrations when compared with the optical densities of control bacteria or bacteria incubated with peptide for only 10 minutes (T0). The reduction in optical density indicates that the bacterial cells are disrupted by the presence of the peptide and suggests that the mechanism of action, under acidic conditions, for all of the LAH peptides studied involves disruption of the bacterial membrane inducing bacterial lysis. At neutral pH however, addition of LAH peptides even at concentrations twice the MIC100 caused, proportionally, a much more modest drop in optical density. This indicates that disruption of the bacterial membrane is not a crucial determinant of the peptide activity when the histidines are not charged. This result is in stark contrast with that of magainin 2 which can be seen to be lytic at pH 7.2 (Fig. 1C) and it is known that disruption of the bacterial membrane

forms 1 s a large part of the killing strategy of this peptide (38, 7). To determine whether the LAH peptides were bacteriostatic or also bactericidal at neutral pH, the cultures were grown as above, incubated with peptides for two hours, washed and then plated. A large number of colonies were observed after incubation with LAH4-L1-F4 at pH 7.2 for two hours indicating that bacteria remain viable even after treatment with this peptide at its MIC100. Very few colonies however, were observed after two hours of incubation with LAH4-L1, LAH6-L1 or magainin 2 at either pH (Fig. 1D), indicating that the LAH peptides are also bactericidal at neutral pH. In summary, the results of these two assays indicate that the LAH peptides are bactericidal, at both acidic and neutral pH, but operate through differing mechanisms depending on the pH.

Solid-state NMR measurements. A detailed picture of the effect of the LAH peptides on the lipid chains in model membranes can be obtained by acquiring wideline ^2H echo spectra of PE/PG lipid mixes in the absence and presence of peptide at acidic and neutral pH. By keeping the peptide concentration constant, at a level (2.5 mole %) where an effect on fatty acyl chain order can be observed by solid-state NMR methods but without disintegration of the membrane as previously observed using static ^{31}P NMR on similarly prepared vesicles (23), and varying the lipid conditions, we can obtain an accurate measure of the role that the differing lipids play in the peptide-lipid interactions. ^2H echo spectra are acquired for hydrated powder samples pelleted by centrifugation from excess buffered solutions which facilitates control of the sample pH. Solid-state ^2H echo spectra of either POPE-d31 or POPG-d31 (Fig. 2A) in mixed POPE/POPE-d31/POPG or POPE/POPG-d31 vesicles reveal the strength of the interaction between LAH4-L1 and either the zwitterionic or anionic lipid component and the ability of the peptide to disrupt the lipid acyl chains (23, 21).

At pH 7.5 LAH4-L1 induces a slight reduction of acyl chain order reflected in the spectra by reduced quadrupolar splittings (Fig. 2A) yet this is small when compared with the effect of the same peptide at pH 5.5 (Fig. 2A). The disruption of the lipid chain order induced by 2.5 mole % LAH4-L1 at pH 5.5 can be seen clearly in the spectra (Fig. 2A) and compared in the calculated order parameter profiles which are displayed relative to the peptide free data (Fig. 2B). It can be seen that, particularly further down the acyl

chain, the anionic PG acyl chains are very strongly disrupted by the presence of LAH4-L1 whilst the acyl chains of the zwitterionic PE lipids are much less affected (Fig. 2B).

Similar spectra of chain deuterated lipids were obtained in the presence of LAH6-L1, LAH4-L1-F4 and the remaining LAH4 isomers (not shown). Importantly, LAH6-L1 caused no disruption of either PE or PG acyl chains at pH 7.5 but was extremely disruptive at acidic pH whilst LAH4-L1-F4 and the remaining LAH4 isomers behaved similarly to LAH4-L1 in terms of their effects on the mobility of the acyl chains of both labelled PE and PG probes.

Antibacterial assays – pathogenic bacteria. Three of the LAH peptides were then selected to be tested against a range of pathogenic bacteria. LAH6-L1 was selected since it had shown the highest activity against both test bacteria, LAH4-L1 since it is the most effective transfection agent and is representative of the LAH4 isomer series, LAH4-L1-F4 to assess the role of the hydrophobic surface and magainin 2 to provide a useful comparison. The efficiency of inhibition of the peptides can be readily compared (Fig. 3). For the LAH peptides, in each case, LAH6-L1 is the most effective antibiotic and it is the only LAH peptide to have any activity against the gram negative bacterium *Pseudomonas aeruginosa* at neutral pH albeit only at higher concentrations (Fig. 3G). In comparison, magainin 2 is as effective against *P. aeruginosa* as against *E. coli* (Fig 3A/G). Magainin 2 though has almost no detectable activity against the *S. aureus* strains (gram positive) used here, but a number of the LAH peptides do demonstrate considerable activity (Fig. 3B-F). These results indicate that the antibiotic efficiency of the peptides is strongly dependent on the organism and that those peptides rich in histidine may succeed where other antibiotic peptides have previously struggled. Our study compares the effects of the four peptides, selected above, against five strains of *S. aureus*, including both methicillin resistant and sensitive *S. aureus* (MRSA and MSSA) strains (Fig. 3B-F). *S. aureus* 2079 is sensitive to multiple antibiotics and it and S4820 are sensitive to methicillin. The remaining three strains are resistant to methicillin whilst all except strain 2079 exhibit resistance to one or more of the aminoglycosyl de antibiotics and erythromycin. The performance of the LAH peptides varies according to the strain tested but it can be seen that LAH4-L1 was efficient at killing four out of

five of the strains tested whilst LAH4-L1-F4 again performed poorly in comparison. LAH6-L1 was in some cases highly effective, showed some killing capacity against all the strains tested (Fig 3B-F) and was the most effective peptide overall displaying some attractive antibiotic capabilities. As observed above, the LAH peptides were poorly active against *P. aeruginosa* at neutral pH (Fig. 3G) but, when the cultures were grown in an acidic environment, the LAH peptides became highly effective antibiotic agents with activities well in excess of magainin 2 (Fig. 3H). Again, LAH6-L1 was the most effective antibiotic and was effective at concentrations as low as 10 μ M.

DISCUSSION

Mechanism of LAH peptide antibacterial action.

Given the major problems being experienced with resistance amongst classical antibiotics, there seems to be considerable promise for the development of effective antibiotics from cationic peptides. However, for the full potential of these peptides to be realised, it is crucial that their mechanism of action be understood since only then will more effective peptides be designed or peptides with either broader or targeted spectra of activity be conceivable.

For this reason we have sought to understand in more detail the mechanism of antimicrobial action of histidine rich cationic amphipathic peptides that have previously been shown to possess antibiotic activity (34). The structural design of LAH4 was inspired by amphipathic helical peptides such as magainin (34). Magainins have been shown to induce channel like activity in biological membranes (12, 14) and, whilst a number of differing mechanisms have been proposed for its killing strategy, disruption of the bacterial membrane is believed by most to be the main cause of cell death (38, 7, 8).

LAH4 though is noticeably different from magainin in that the positively charged lysines are located at the N and C termini, as anchors, rather than dispersed along the helix. The result of this is that LAH4 adopts a trans-membrane orientation at neutral pH (5) in contrast to magainin and other cationic helical peptides which are oriented parallel to the membrane surface (5, 6, 21). Consistent with this, our 1 data show that at neutral pH, the LAH peptides use a rather different killing strategy when compared with magainin 2 since at peptide levels at even double the concentration at which the peptides inhibit growth with 100% efficiency (MIC100), no cell

lysis was observed. In addition, increasing the hydrophobicity of the already hydrophobic face of the peptide by introducing four phenylalanine residues reduces the activity against all bacteria tested. Whilst the mechanism of antibiotic activity of the LAH peptides at neutral pH is obscure and is an interesting line of further study, its strategy may therefore centre on nucleic acid binding or the inhibition of nucleic acid and/or protein synthesis as has been shown for buforin 2, tachyplesin, and pleurocidin amongst other cationic peptides (26, 36, 27).

Solid-state NMR. At acidic pH the observed activity of the LAH peptides is altered in a number of aspects. Firstly the activity of the LAH peptides against *E. coli*, and to a lesser extent *B. megaterium*, is enhanced. Secondly the LAH peptides are lytic at acidic pH as evidenced by a drop in the optical density when peptides are added to bacterial cultures at their effective concentrations. LAH4 has been shown to adopt an in-plane orientation at acidic pH when the histidine residues become protonated below a pH of approximately 6.1 (4). In this orientation the peptides disrupt the membrane much more efficiently (34) and have been shown to interact strongly with anionic lipids (23). Recently we have used solid-state NMR as a tool to probe lipid chain order of ²H labelled lipids in mixed membrane environments (21-23). Briefly, synthetic lipids carrying ²H labels throughout the length of, in this case, the saturated acyl chain are incorporated into lipid vesicles. The observed quadrupolar splittings for each CD₂ group (Fig. 2) are scaled according to the order profile of the membrane (30) allowing a measure of membrane disorder to be determined on binding and insertion of the peptide (e.g. 21-23). This method is particularly effective at discriminating between anionic and zwitterionic lipid components when membrane active peptides are added to the system and recently we have shown that pleurocidin, a cationic amphipathic helical and histidine rich peptide from Winter Flounder, disturbs anionic lipids in mixed PE/PG model membranes, without affecting the overall morphology of the bilayer, at concentrations where channel like activity has been observed (21). Using the same solid-state NMR method we see that at acidic pH, the disruption of the chain order in anionic PG in the presence of each of the LAH4 isomers is rather dramatic and is of a much greater magnitude than that of the zwitterionic PE lipid chains. Hence we propose a model for LAH peptide induced

disruption of the membrane at acidic pH whereby the observed changes in the spectra can be interpreted as a general increase in the mobility of the lipid chain where the strongly cationic LAH peptides insert into the membrane and bind preferentially, but not exclusively, to the anionic PG in the head group interface region without causing an overall change in the morphology of the membrane. The resulting increase in the separation of the anionic lipids allows an increase in the disorder or *cis-trans* isomerisations at the level of the fatty acyl chains which is reflected in the observed reduction of order parameter throughout the acyl chain. This model can be compared with a previous study of the membrane insertion of ethanol at the hydrocarbon-water interface (3) where the hydrophobic core of the membrane also becomes disordered, albeit at rather high ethanol concentrations, and a very recent study of the effect of both melittin and magainin derived peptides on deuterated POPC (28), where both these peptides adopt an in plane orientation and disrupt acyl chain order in a similar fashion to that shown here for the LAH peptides at acidic pH.

Interestingly, the disruption of the PG acyl chains at acidic pH is much greater for LAH4-L1 when compared with the effect of pleurocidin at the same concentration (21). This may reflect the nature of the charged residues responsible for the interaction with the anionic lipids since, with pleurocidin, the interaction is likely mediated by lysine residues with relatively long, flexible side chains whilst histidine residues are uniquely responsible for this interaction for LAH4-L1.

Activity of LAH peptides against pathogenic bacteria. At neutral pH the LAH peptides demonstrate clear antibiotic activity against both methicillin sensitive and resistant strains of *S. aureus* but are almost completely ineffective against *P. aeruginosa*. Importantly however, we show that lowering the pH in the medium activates the peptides and LAH4-L1 and LAH6-L1 become highly active under acidic conditions against *P. aeruginosa*, a pathogen that commonly infests the airways of cystic fibrosis patients. The high antimicrobial activity of the peptides at acidic pH *in vitro* may be directly relevant to *in vivo* applications since the epithelial lining fluid can become rather acidic as a result of certain conditions. Exhaled human breath condensate has a pH of approximately 6.15, but in patients with cystic fibrosis, for example, this value can fall as

low as 5.32 (33). Certain antimicrobial peptides have been shown recently to be effective against *P. aeruginosa* *in vivo* (40) a fact that increases the likelihood that histidine rich peptides may be similarly applicable to combat lung infections.

The mechanism of disruption of the bacterial membrane has been the target of a large number of studies that seek to understand how cationic helical peptides function, yet it has been shown that, for a number of cationic peptides, membrane depolarisation is incomplete even when 90% or more bacteria have been killed. Hence, although the membrane interactions of cationic antibiotic peptides are an important factor, it may be important for entry into the cell but not constitute the main killing mechanism among many classes of peptide (15, 35, 11). This finding is consistent with our demonstration of

antibiotic activity of the LAH peptides despite the absence of significant membrane disruption. Nevertheless, the antibacterial activity of LAH peptides is modulated strongly by the pH of the media and the enhanced activity of LAH peptides at acidic pH against the test bacteria, *E. coli* and *B. megaterium*, and the activation of the peptides at low pH against *P. aeruginosa* indicates that the effective disruption of the membrane is a key component of the antibiotic mechanism.

ACKNOWLEDGMENT AJM thanks Gérard Nullans for mass spectrometry analysis. This work was supported by Vaincre la Mucoviscidose (TG0501), Inserm, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg (PHRC3150 to MHMB), Université Louis Pasteur (Post-doc grant to AJM) and the CNRS (Poste Rouge for AJM).

REFERENCES

- 1- **Aisenbrey, C., Kinder, R., Goormaghtigh, E., Ruyschaert, J.-M., and Bechinger, B.** (2006) Interactions involved in the realignment of membrane-associated helices: an investigation using oriented solid-state NMR and ATR-FTIR spectroscopies, *J. Biol. Chem.* **281**, 7708-7716 2.
- 2- **Bal, A.M., and Gould, I.M.** (2005) Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and its relevance in therapy, *Expert Opin. Pharmacother.* **6**, 2257-2269 3.
- 3- **Barry, J.A. and Gawrisch, K.** (1994) Direct NMR evidence for ethanol binding to the lipid-water interface of phospholipids bilayers, *Biochemistry* **33**, 8082-8088 4.
- 4- **Bechinger, B.** (1996) Towards membrane protein design: pH-sensitive topology of histidine containing polypeptides, *J. Mol. Biol.* **263**, 768-775 5.
- 5- **Bechinger, B.** (1997) Structure and functions of channel-forming polypeptides: magainins, cecropins, melittin and alamethicin, *J. Membr. Biol.* **156**, 197-211 6.
- 6- **Bechinger, B.** (1999) The structure, dynamics and orientation of antimicrobial peptides in membranes by solid-state NMR spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta* **1462**, 157-183 7.
- 7- **Bechinger, B.** (2004) Membrane-lytic peptides, *Crit. Rev. Plant Sci.* **23**, 271-292 8.
- 8- **Bechinger, B.** (2005) Detergent-like properties of magainin antibiotic peptides: A ³¹P solid-state NMR spectroscopy study, *Biochim. Biophys. Acta* **1712**, 101-108 9.
- 9- **Bechinger, B., Zasloff, M., and Opella, S.J.** (1993) Structure and orientation of the antibiotic peptide magainin in membranes by solid-state nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Protein Science* **2**, 2077-2084 10.
- 10- **Boman, H.G., Agerberth, B., and Boman, A.** (1993) Mechanisms of action on *Escherichia coli* of cecropin P1 and PR-39, two antibacterial peptides from pig intestine, *Infect. Immun.* **61**, 2978-2984 11.
- 11- **Brogden, K.A.** (2005) Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology* **3**, 238-250 12.
- 12- **Cruciani, R.A., Barker, J.L., Raghunathan, G., Guy, H.R., Zasloff, M., and Stanley, E.F.** (1992) Magainin 2, a natural antibiotic from frog skin, forms ion channels in lipid bilayer membranes, *Eur. J. Pharmacol.* **226**, 287-296 13.
- 13- **Davis, J.H.** (1983) The description of membrane lipid conformation order and dynamics by ²H NMR, *Biochim. Biophys. Acta* **737**, 117-171 14.
- 14- **Duclohier, H., Molle, G., and Spach, G.** (1989) Antimicrobial peptide magainin I from *Xenopus* skin forms anion-permeable channels in planar lipid bilayers, *Biophys. J.* **56**, 1017-1021 15.

- 15- **Friedrich, C.L., Moyles, D., Beveridge, T.J., and Hancock, R.E.W.** (2000) Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on Gram-positive bacteria, *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2086-2092 16.
- 16- **Hancock, R.E.W., and Patrzyat, A.** (2002) Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel peptides, *Current Drug Targets – Infectious Disorders* **2**, 79-83 17.
- 17- **Kichler, A., Leborgne, C., März, J., Danos, O., and Bechinger, B.** (2003) Histidine-rich amphipathic peptide antibiotics promote efficient delivery of DNA into mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1564-1568 18.
- 18- **Kichler, A., Mason, A.J., and Bechinger, B.** (2006) Cationic amphipathic histidine-rich peptides for gene delivery, *Biochim. Biophys. Acta* **1758**, 301-307 19.
- 19- **Lindman, H. R.** (1974). *Analysis of variance in complex experimental designs*. San Francisco: W. H. Freeman & Co. 20.
- 20- **Macia, M.D., Blanquer, D., Togores, B., Sauleda, J., Perez, J.L., and Oliver, A.** (2005) Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections, *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3382-3386 21.
- 21- **Mason, A.J., Chotimah, I.N.H., Bertani, P., and Bechinger, B.** (2006) A spectroscopic study of the membrane interaction of the antimicrobial peptide pleurocidin. *Mol. Membr. Biol.* **23**, 185-194 22.
- 22- **Mason, A.J., Lopez, J.J., Beyermann, M., and Glaubitz, C.** (2005) A spectroscopic study of the membrane interaction of Tuberoinfundibular Peptide of 39 Residues (TIP39), *Biochim. Biophys. Acta* **1714**, 1-10 23.
- 23- **Mason, A.J., Martinez, A., Glaubitz, C., Danos, O., Kichler, A., and Bechinger, B.** (2006) The antibiotic and DNA transfecting peptide LAH4 selectively associates with, and disorders, anionic lipids in mixed membranes, *FASEB J.* **20**, 320-322 Epub 2005 Dec 13 10.1096/fj.05-4293fje 24.
- 24- **Merrifield, R.B.** (1963) Solid phase peptide synthesis: synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149-2154 25.
- 25- **Oliver, A., Cantón, R., Campo, P., Baquero, F., and Blázquez, J.** (2000) High Frequency of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* in Cystic Fibrosis lung infection, *Science* **288**, 1251-1253 26.
- 26- **Park, C.B., Kim, H.S., and Kim, S.C.** (1998) Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin II: buforin II kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **244**, 253-257 27.
- 27- **Patrzykat, A., Friedrich, C.L., Zhang, L., Mendoza, V., and Hancock, R.E.** (2002) Sublethal concentrations of pleurocidin derived antimicrobial peptides inhibit macromolecular synthesis in *Escherichia coli*, *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 605-614 28.
- 28- **Ramamoorthy, A., Thennarasu, S., Lee, D-K., Tan, A. and Maloy, L.** (2006) Solid-state NMR investigation of the membrane-disrupting mechanism of antimicrobial peptides MSI-78 and MSI-594 derived from magainin 2 and melittin, *Biophys. J.* **91**, 206-216 29.
- 29- **Schäfer, H., Mädler, B., and Volke, F.** (1995) De-PAKE-ing of NMR powder spectra by nonnegative least-squares analysis with Tikhonov regularization, *J. Magn. Reson.* **116**, 145-149 30.
- 30- **Seelig, A., and Seelig, J.** (1974) Dynamic structure of fatty acyl chains in a phospholipid bilayer measured by deuterium magnetic-resonance *Biochemistry* **13**, 4839-4845 31.
- 31- **Sternin, E., Bloom, M., and MacKay, A.L.** (1983) De-PAKE-ing of NMR Spectra, *J. Magn. Reson.* **55**, 274-282 32.
- 32- **Subbalakshmi, C., and Sitaram, N.** (1998) Mechanism of antimicrobial action of indolicidin, *FEMS Microbiol. Lett.* **160**, 91-96 33.
- 33- **Tate, S., MacGregor, G., Davis, M., Innes, J.A., and Greening, A.P.** (2002) Airways in cystic fibrosis are acidified: detection by exhaled breath condensate, *Thorax* **57**, 926-929 34.
- 34- **Vogt, T.C.B., and Bechinger, B.** (1999) The interactions of histidine-containing amphipathic helical peptide antibiotics with lipid bilayers, *J. Biol. Chem.* **274**, 29115-29121 35.
- 35- **Wu, M., Amier, E., Benz, R., Hancock, R.E.W.** (1999) Mechanism of interaction of different classes of cationic antimicrobial peptides with planar bilayers and with the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*, *Biochemistry* **38**, 7235-7242 36.
- 36- **Yonezawa, A., Kuwahara, J., Fujii, N., and Sugiura, Y.** (1992) Binding of tachyplesin I to DNA revealed by footprinting analysis: significant contribution of secondary structure to DNA binding and implication for biological action, *Biochemistry* **31**, 2998-3004 37.

- 37- **Zasloff, M.** (1987) Magainins, a class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor, Proc. Natl Acad. Sci. USA **84**, 5449-5453 38.
- 38- **Zasloff, M.** (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms, Nature **415**, 389-395 39.
- 39- **Zasloff, M., Martin, M., and Chen, H-C.** (1988) Antimicrobial activity of synthetic magainin peptides and several analogues, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **85**, 910-913 40.
- 40- **Zhang, L., Parente, J., Harris, S.M., Woods, D.E., Hancock, R.E.W., and Falla, T.J.** (2005) Antimicrobial peptide therapeutics for cystic fibrosis, Antimicrob. Agents. Chemother. **49**, 2921- 2927

Table 1. The sequences of LAH4 isomers, derivatives and magainin 2 used in this study and their corresponding concentrations giving 50% inhibition of two model bacteria (MIC). The peptides are all C terminal amidated contributing one extra positive charge overall. At neutral pH the LAH peptides and magainin 2 all have a nominal charge of +5. MIC (μM) Peptide Sequence *E. coli* *B. megaterium*

Peptide	Sequence	Nominal charge at pH 5.5	MIC (μM)			
			<i>E. coli</i>		<i>B. megaterium</i>	
			pH 7.2	pH 5.5	pH 7.2	pH 5.5
LAH4-L0	KKALLAHALHLALLALHLHLKKA	+9	5	0.5	5	1
LAH4-L1	KKALLAHALHLLALLALHLAHALKKA	+9	5	0.5	5	5
LAH4-L2	KKALLALALHHLALLALHLAHALKKA	+9	5	0.5	5	5
LAH4-AL6	KKALLHLALALLALHAHALALHLKKA	+9	5	0.5	5	1
LAH4-L1-F4	KKALLAHFFHLLALLALHFFHALKKA	+9	20	0.5	10	5
LAH6-L1	KKALLAHALHHLALLAHHLAHALKKA	+11	1	0.5	1	1
Magainin 2	GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	+6	15	0.5	10	5

FIGURE CAPTIONS

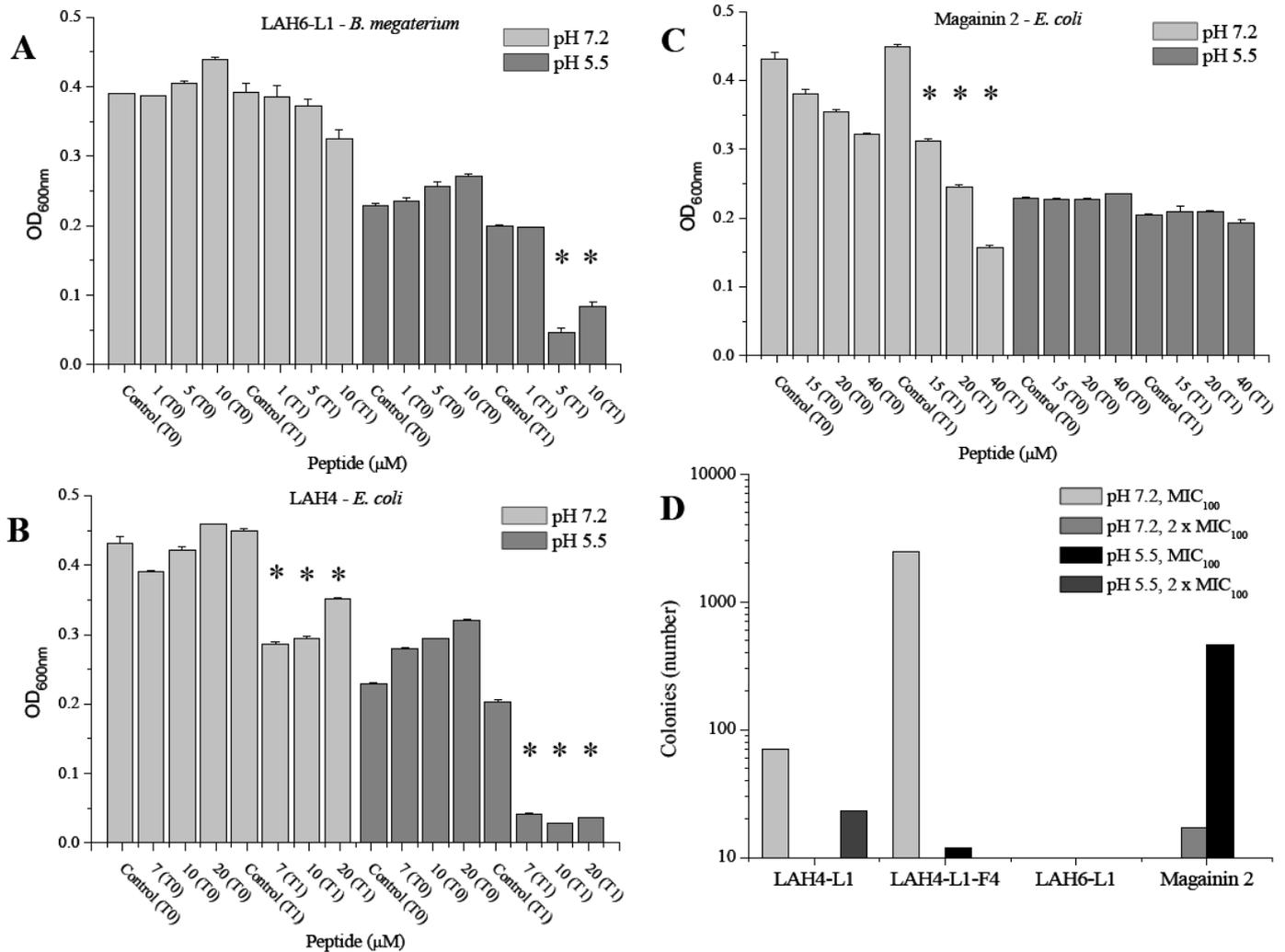


Figure 1. The effect of two LAH antibiotic peptides and magainin 2 on culture optical density (OD_{600nm}) at both acidic and neutral pH. Peptides were added at concentrations corresponding to their MIC₅₀, MIC₁₀₀ and two times the MIC₁₀₀. The optical densities of the test bacteria are after 10 minutes (T0) and 2 hours (T1) incubation for LAH6-L1 against *B. megaterium* (A) and LAH4 (B) and magainin 2 (C) against *E. coli*. Error bars represent the standard deviation of the mean whilst an asterisk denotes $P < 0.01$ for T1 measurement compared with both control and T0 measurements. Bacteria (*E. coli*) viability after incubation with peptide in the same conditions is shown by the number of colonies produced on a solid support (D). LAH4-L1 and LAH6-L1 are effective bactericidal peptides despite the apparent lack of membrane disruption but a large number of cells remain viable after treatment with LAH4-L1-F1 at neutral pH. More than 3000 colonies were counted on plates with no peptide treatment.

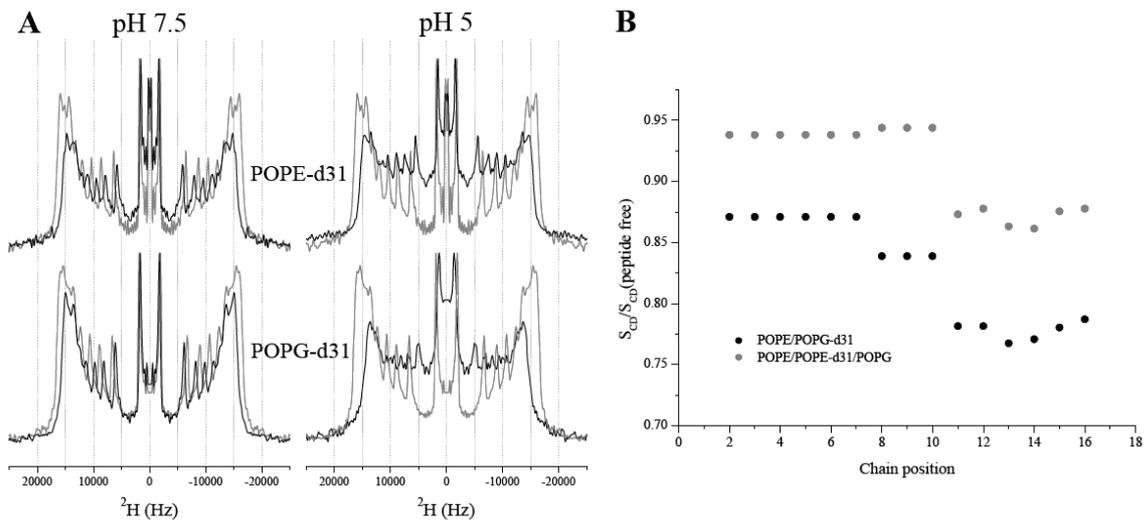


Figure 2. Comparison of ^2H quadrupolar echo spectra of POPG-d31 or POPE-d31 in lipid vesicles containing POPE/POPG-d31 (75:25) or POPE/POPE-d31/POPG (50:25:25) in the absence (grey lines) or presence (black lines) of 2.5 mole % of LAH4-L1 at either pH 7.5 or 5 (A). Spectra were recorded on a Bruker Avance 300 spectrometer at 298K. A comparison of order parameter profiles for LAH4-L1/lipid vesicle complexes at pH 5 containing POPE-d31 or POPG-d31 as a reporter of mobility (B) reveals the response of the lipid acyl chains in either the zwitterionic or anionic lipid to the presence of the peptide. There is a slight reduction in order throughout the POPE acyl chain with a light enhancement of the effect in the lower third but this effect is noticeably enhanced when anionic POPG is used as a reporter.

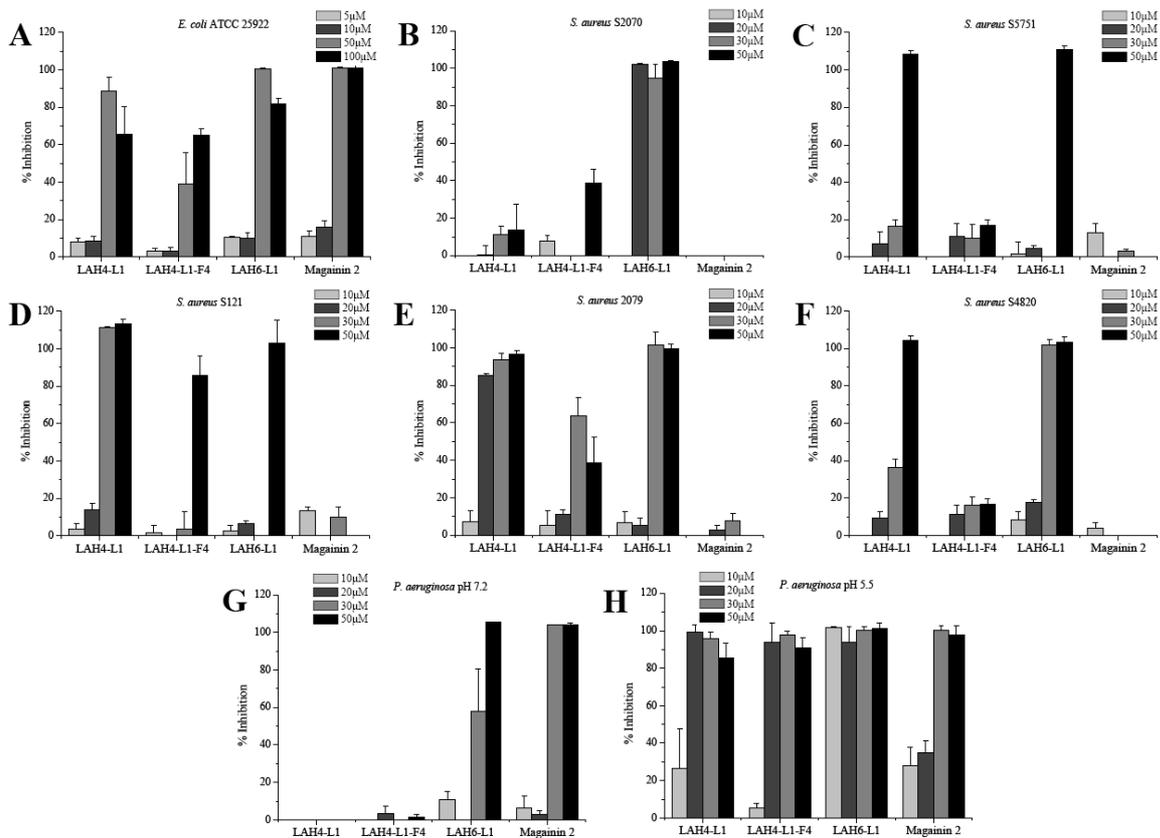


Figure 3. Charts comparing the inhibitory efficiency of selected LAH peptides and magainin 2 on the growth of the pathogenic bacteria *Escherichia coli* 25922 (A), methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) strains S2070 (B), S5751 (C) and S121 (D), and methicillin sensitive *S. aureus* (MSSA) strains 2079 (E) and S4820 (F) at pH 7.2. *P. aeruginosa* 27853 was challenged with the same peptides at both pH 7.2 (G) and pH 5.5 (H).



[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Identification of Morphine-6-glucuronide in Chromaffin Cell Secretory Granules

Yannick Goumon, Arnaud Muller, Elise Glattard, Céline Marban, **Claire Gasnier**, Jean-Marc Strub, Sylvette Chasserot-Golaz, Olivier Rohr, George B. Stefano, Ingeborg D. Welters, Alain Van Dorsselaer, Françoise Schoentgen, Dominique Aunis, and Marie-Hélène Metz-Boutigue

The Journal of Biological Chemistry, 2006, Vol. 281, Pages 8082-8089

Pages 8082 à 8089 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/M502298200v1>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

The FASEB Journal express article 10.1096/fj.02-0699fje.
Published online February 19, 2003.

The N- and C-terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities

Anne-Estelle Kieffer,* Yannick Goumon,* Olivier Ruh,* Sylvette Chasserot-Golaz., Gérard Nullans,* Claire Gasnier,* Dominique Aunis,* and Marie-Hélène Metz-Boutigue*

*INSERM Unité 575, IFR 37, Physiopathologie du système nerveux, 5 rue Blaise Pascal, Strasbourg, France; .CNRS UPR 2356, IFR 37, Neurotransmission et Sécrétion Neuroendocrine, 5 rue Blaise Pascal, Strasbourg, France

Corresponding author: Marie-Hélène Metz-Boutigue, INSERM Unité 575, IFR 37, Physiopathologie du système nerveux, 5 rue Blaise Pascal, 67084 Strasbourg Cedex, France.

E-mail: metz@neurochem.u-strasbg.fr

ABSTRACT

Secretory granules of chromaffin cells contain catecholamines and several antimicrobial peptides derived from chromogranins and proenkephalin-A. These peptides are secreted in the extracellular medium following exocytosis. Here, we show that ubiquitin is stored in secretory chromaffin granules and released into the circulation upon stimulation of chromaffin cells. We also show that the C-terminal fragment (residues 65.76) of ubiquitin displays, at the micromolar range, a lytic antifungal activity. Using confocal laser scan microscopy and rhodamine-labeled synthetic peptides, we could demonstrate that the C-terminal peptide (residues 65.76) is able to cross the cell wall and the plasma membrane of fungi and to accumulate in fungi, whereas the N-terminal peptide (residues 1.34) is stopped at the fungal wall level. Furthermore, these two peptides act synergistically to kill filamentous fungi. Because of the interaction of the C-terminal sequence of ubiquitin with calmodulin, the synthetic peptide (residues 65.76) was tested *in vitro* against calmodulin-dependent calcineurin, an enzyme crucial for fungal growth. This peptide was found to inhibit the phosphatase activity of calcineurin. Our data show a new property of ubiquitin C-terminal-derived peptide (65.76) that could be used with N-terminal peptide (1.34) as a new potent antifungal agent.

Key words: chromaffin cells • calmodulin • calcineurin activity

The need for antifungal agents increases in parallel with the expanding number of immunocompromised patients at risk for invasive fungal infections (e.g., chemotherapy, grafts, human immunodeficiency virus type-1 syndrome, and prolonged antibiotherapy). A rapid and active response to challenge pathogens is essential for the survival of all living organisms. The production of a large variety of natural nontoxic antimicrobial peptides from both plants and animals is attracting increasing attention, and the importance of these molecules is clearly established in the immune defense of

invertebrates (1, 2). In vertebrates, they act as a first line of defense against pathogens and in the control of natural flora (1, 3). Antimicrobial peptides are evolutionarily ancient weapons and have served a fundamental role in the successful evolution of complex multicellular organisms (4). Similarities have been highlighted between pathogen recognition, signaling pathways, and effector mechanisms of innate immunity in *Drosophila* and mammals (5).

Recently, we have discovered and characterized new natural antimicrobial peptides derived from

the processing of chromogranin A (CGA) and B (CGB) and proenkephalin-A (PEA), which are secreted with catecholamines upon stimulation of chromaffin cells in adrenal medulla (6.10). It has been hypothesized that these peptides play a role in stress situations, acting as an immediate protective shield against pathogens (9). Among these active neuropeptides, the antifungal natural peptide vasostatin-1 (CGA1.76) (10) and its derived fragment chromofungin (CGA47.66) have recently been described (11).

Furthermore, we have shown that the potent antifungal activity of chromofungin is due to its ability to cross microorganism cell membranes and to inhibit the calmodulin (CaM)-dependent activation of essential enzymes (11). Ubiquitin (Ub) is a peptide of 76 residues, found in all eukaryotic cells and with a wellconserved sequence from protozoan to vertebrates (12.14). It conjugates to intracellular target proteins, in a process that appears to be the initiation step for selective protein degradation by the 26S proteasome and serves as a signal for the endocytosis of plasma membrane proteins (15). It is now clear that Ub can act as a regulated sorting signal at different steps of the endosomal and biosynthetic pathways (16).

Here, in continuation of our studies, using Western blot analysis, we report the subcellular localization of free Ub in bovine adrenal medullary chromaffin cells. Ub is present in secretory granules and secreted with catecholamines upon chromaffin cell stimulation and displays *in vitro* antimicrobial properties. Confocal laser microscopy on filamentous fungi, using rhodaminelabeled synthetic peptides Ub1.34R and Ub65.76R, showed the ability of these peptides to interact with (Ub1.34R, Ub65.76R) and to cross through the cell wall and accumulate in microorganisms (Ub65.76R). We demonstrated that the N- and C-terminal fragments (Ub1.34 and Ub65.76, respectively) act synergistically to kill fungi by destabilization of fungal cell wall and plasma membrane. Furthermore, this mechanism may be completed by the inhibition of intracellular CaM-dependent enzymes.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of proteins from subcellular fractions of chromaffin cells

Subcellular fractions (i.e., plasma membrane, cytoplasm, intragranular and granule-membranebound proteins) of chromaffin cells were isolated from bovine adrenal medulla dissected from 20 glands, according to a procedure first validated by Smith and Winkler (17). The preparation of chromaffin granules requires a method of isolation that combines both good yield and high purity. These two criteria are met by a density gradient procedure in which the cell particles are centrifuged on a layer of 1.6 M sucrose solution. After sucrose-gradient fractionation, plasma membrane and cytoplasm, at the top of the gradient, were collected and stored at .20°C. Chromaffin granules sedimented as a typical pink layer after centrifugation on 1.6 M sucrose solution (100,000g for 90 min at 4°C). They were then suspended in 10 mM Hepes at pH 7.0, washed several times with this buffer to avoid cytoplasmic contamination, and lysed by successive freezing-thawing cycles. The intragranular matrix was separated after centrifugation at 100,000g for 30 min at 4°C, collected, acidified with trifluoroacetic acid up to 0.1%, and stored at .20°C (18). Pellet corresponding to granule membranes was suspended in NaCl/Pi buffer (25 mM sodium phosphate containing 0.9% NaCl at pH 7.5) and centrifuged at 100,000g for 30 min. To eliminate possible contamination by intragranular matrix component, we repeated this procedure three times. Proteic material present in granule membranes was extracted by incubation in 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.2 mg/ml aprotinin, 50 mM octyl- β -Dglucopyranoside, 10 mM Hepes, pH 7.4. After centrifugation at 100,000g for 15 min, the supernatant containing granule membrane proteins was diluted twice in NaCl/Pi buffer.

To remove salts, we loaded subcellular fractions onto a Sep-Pak Plus C-18 cartridge (Waters, Milford, MA), previously activated with acetonitrile and washed with acidified water (v/v; 0.1% trifluoroacetic acid). For each fraction, soluble material was eluted with 0.1% trifluoroacetic acid in 60% aqueous acetonitrile solution, concentrated by evaporation (but not to complete dryness), and stored at .20°C.

Isolation of proteins released from stimulated chromaffin cells

Chromaffin cells (2×10^8) were isolated from fresh bovine adrenal glands, cultured as previously reported (18), and plated at a density

of 107 cells/100 mm in plastic Petri dishes. After 3 days in culture, cells were washed four times with Locke's solution (140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 11 mM glucose, 0.5 mM ascorbic acid, 15 mM Hepes, pH 7.4) to clean out dead cells or cell debris (19). The extracellular medium of nonstimulated cells was collected and used as a control. Chromaffin cells were subsequently stimulated for 10 min with 20 µM nicotine in Locke's solution. The external medium was carefully collected, centrifuged at 800g for 10min at 4°C to remove cells that might be present in secretions, and acidified with trifluoroacetic acid up to 0.1% (v/v). Samples were then desalted onto a Waters Sep-Pak Plus C- 18 as described previously and stored at .20°C (18).

Western blot analysis

The soluble proteins from cytoplasm (30 µg), intragranular material (50 µg), plasma (15 µg), and granule membrane (50 µg) were separated on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (20) containing high acrylamide concentration (17%) in order to separate proteins with low molecular mass (Ub, 8 kDa). Proteins were electrotransferred (45 min, 75 V) onto PVDF membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire England) (21), and immunodetection was performed with rabbit polyclonal antibodies raised against Ub (8 kDa, dilution 1:100, Sigma, St. Louis, MO); phenylethanolamine N-methyl transferase (PNMT, 31 kDa, dilution 1:4,000), used as a cytosolic marker; dopamine-β-hydroxylase (DBH, 70 kDa for each subunit, dilution 1:2,500), used as granular membrane marker; and CGA (66 kDa, dilution 1:1,000), used as a granule matrix marker. To detect immunoreactive bands, we first soaked a PVDF sheet in NaCl/Pi buffer (25 mM sodium phosphate containing 0.9% NaCl at pH 7.5) with 3% bovine serum albumin (BSA) for 1 h at 37°C. The membrane was then incubated with the first antibody with NaCl/Pi buffer containing 3% BSA and 0.05% Tween 20 at the dilution described previously (1 h, 37°C). After it was washed with NaCl/Pi buffer containing 0.05% Tween 20 (six times for 5 min each time, the PVDF sheet was incubated with a biotinylated goat anti-rabbit IgG antibody (Sigma, 1:1500) for 30 min at 37°C in NaCl/Pi buffer containing 3% BSA and 0.05% Tween 20. After six washes (5 min) by NaCl/Pi buffer with 0.05% Tween 20, the membrane was incubated for 30 min at 37°C,

with ExtrAvidin-Peroxydase conjugate (Sigma) in NaCl/Pi buffer containing 3% BSA. The membrane was then washed six times (5 min) with NaCl/Pi buffer containing 0.05% Tween 20, and once for 5 min with deionized water. Immunodetection was performed with the ECL-Plus kit (Amersham Pharmacia Biotech) according to the manufacturer's instructions. Color markers with a molecular weight range of 6.5.205 kDa (Sigma Chemical) were used.

Preparation of Ub and Ub-derived peptides

Secretions from stimulated chromaffin cells were purified using a Nucleosil reverse-phase 300. 5C18-column (4×250 mm; particle size, 5 µm; porosity, 300 Å) (Macherey Nagel Hoerd, France). Absorbance was monitored at 214 nm, and the solvent system consisted of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in water (solvent A) and 0.09% (v/v) trifluoroacetic acid in acetonitrile (solvent B). Elutions were performed at a flow rate of 700 µl/min using gradients indicated on chromatograms.

Ub from bovine erythrocytes (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) was digested for 18 h at 37°C by endoproteinase Glu-C (E.C. 3.4.21.19; Boehringer Mannheim, Germany) at a protein-to-enzyme weight ratio of 50:1 in 50 mM Tris-HCl, pH 8.3. The Ub-derived fragments were isolated using a Macherey Nagel Nucleosil reverse-phase column, according to the experimental conditions described for the Ub purification, and the elution was performed using the gradient indicated on the chromatogram.

Antibacterial activity

Bacteria were precultured aerobically at 37°C in a Mueller-Hinton-Broth medium (Difco Laboratories, Detroit, MI), pH 7.3. The following bacteria strains were tested: *Micrococcus luteus* (A270), *Bacillus megaterium* (MA), *Listeria monocytogenes* (S47014), *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis* (QB935), *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* (D6H), *Salmonella typhimurium*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 82118), and *Escherichia coli* (SBS363 and D22). Bacteria were suspended in the Mueller-Hinton-Broth medium, and antibacterial activity was tested by measuring the inhibition of bacterial growth (22). Aqueous peptide solutions (10 µl) were incubated in microtiter plates with 90 µl of a

midlogarithmic phase culture of bacteria, with a starting absorbance of 0.001 at 620 nm (23). Microbial growth was assessed by the increase of absorbance after 16 h incubation at 37°C. The A620nm value of control cultures growing in the absence of peptide was taken as 100%, and the MIC (minimal inhibitory concentration) was expressed in micromolar.

Antifungal activity

Filamentous fungi were grown on a five-cereal medium and the spores were harvested as described previously (24). The following filamentous fungi strains were used: *Trichoderma viride* (MUCL 29724), *Tricophyton mentagrophytes*, *Nectria haematococca* (160.2.2), *Fusarium culmorum* (MUCL 30162), *Fusarium oxysporum* (MUCL 909), *Neurospora crassa* (CBS 327.54), and *Aspergillus fumigatus*. Yeast cells were precultured on a Sabouraud medium, and four strains were tested: *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, and *Candida neoformans*. To test the antifungal activity of Ub-derived peptides, we suspended spores at a final concentration of 104 spores/ml in a growth medium containing Potato Dextrose Broth (PDB, half-strength; Difco, Becton Dickinson Microbiology Systems, Sparks MD) and yeast cells in a Sabouraud medium with starting absorbance of 0.001 at 620 nm. These media were supplemented with tetracycline (10 µg/ml) and cefotaxime (0.1 µg/ml). Fungal growth was assessed after an appropriate incubation period, specific to each fungi (21 h or 48 h at 30°C). Aliquots of peptide extract (10 µl) were incubated in microtiter plates with 90 µl of fungal spores or yeast cultures. Growth of fungi was monitored microscopically and was also evaluated by measuring the culture absorbance at 595 nm, using a microplate reader. Yeast cell growth was assessed by the increase of absorbance at 620 nm.

N-terminal sequence analysis

The sequence of purified free Ub from secretions of stimulated chromaffin cells and Ub-derived peptide (65.76), resulting from the digestion of Ub with endoproteinase Glu-C, was determined in our laboratory by automatic Edman degradation on an Applied Biosystems (Perkin Elmer, Boston, MA) 473A sequencer at the picomolar range. Samples purified by HPLC were loaded on polybrene-treated and precycled glass-fiber filters (18). Phenylthiohydantoin-

amino acids were identified by chromatography on a C18 column (PTH C18, 2.1×200 mm).

Mass spectra analysis

Determination of molecular mass at the femtomolar range was performed in our laboratory on a Bruker BIFLEX (Wissembourg, France) MALDI-TOF mass spectrometer, according to the procedure previously reported (25). A micromolar analyte solution (0.5 µl) was applied to the matrix and dried under moderate vacuum. After fast spreading and evaporation of the solvent, we obtained a thin layer of matrix crystals (26, 27). This preparation was washed by applying 1 µl of a 0.5% TFA in water and then flushed after a few seconds.

Preparation of synthetic peptides

Peptides were synthesized in our laboratory on an Applied Biosystems 432A peptide synthesizer (Synergy, Foster City, CA), using the stepwise solid-phase synthetic approach (28) with 9-fluoromethoxycarbonyl (Fmoc chemistry). Then, the synthetic peptides were purified by chromatography on a C18 column (Vydac, Hesperia, CA; 218 TP 5µ 10 × 250 mm). After lyophilization, synthetic peptides were analyzed by sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry. For fluorescence study, peptides were dissolved in diisopropylethylamine and labeled by the addition of 5,6-carboxytetramethylrhodamine and 1-hydroxybenzotriazole/*o*-benzotriazol-1-yl-*N,N,N',N'*-tetramethyluroniumhexafluorophosphate as a coupling agent (11).

Confocal laser scan microscopy

The poly-L-lysine-coated chambered coverglass system (×8, Lab Tek, 0.8 cm², Nalge Nunc International, Naperville, IL) was covered with 180 µl of medium (one-half PDB) containing *A. fumigatus* or *N. crassa* (104 spores/ml) at 30°C for 21 h or 23 h, respectively. Then, rhodaminelabeled synthetic peptides (Ub1.34R, Ub65.76R, and CGB602.626R) were added to culture medium (30°C). After incubation, chambers were washed with fresh culture medium and subsequently treated for 1 h with 4% paraformaldehyde in 0.12 M sodium/potassium phosphate, pH 7.2. After several rinses with NaCl/Pi, chambers were covered with Elvanol-Mowiol.

Fluorescence staining was monitored with a Zeiss (Gottingen, Germany) laser scanning

microscope (LSM 510) equipped with planapoil (63×) immersion lens (numerical aperture, 1.4). Rhodamine emission was excited using the He/Ne laser 543-nm line, and the emission signal was filtered with a Zeiss long pass 595-nm filter. Fungi were subjected to optical serial sectioning (0.2.0.3 μm) to produce images in the *x-y* plane. Each optical section was scanned four times to obtain an average image. Images were recorded digitally in a 512- × 512-pixel format.

Calcineurin activity assay

To measure the calcineurin phosphatase activity, we used the BIOMOL GREEN assay kit provided by TEBU (Le Perray-en-Yvelines, France), including a 96-well microtiter plate format with all reagents supplied by the manufacturer. The RII phosphopeptide substrate (DLDVPIPGRFDRRVpSVAAE) is an efficient substrate for calcineurin, corresponding to a peptide derived from the cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit (RII), except that C17 has been replaced with A17, without change in the enzymatic assay of calcineurin (29). The detection of free phosphate released is based on the classic malachite green assay (30, 31).

RESULTS

Ub is an antimicrobial component present in secretions of stimulated chromaffin cells

Proteins (200 μg) of stimulated chromaffin cells, recovered in the extracellular medium after direct depolarization of cultured chromaffin cells (2×10⁸ cells) with 20 μM nicotine were separated by HPLC with a reverse-phase column (Fig. 1). In addition to catecholamines, material present in chromaffin granules and secreted by stimulated chromaffin cells contains a large number of peptides derived from chromogranins (CGs) and PEA (32). Antibacterial activity against *M. luteus* (Gram-positive bacteria) was measured and detected in several fractions. We focused on the active fraction eluted at 37% B as indicated by the arrow in figure 1A. Automatic Edman degradation revealed the presence of the predominant sequence MQIFVKLTGKT that corresponds to the N-terminal end of bovine Ub. Control experiments revealed that in similar experimental conditions of chromatography, Ub1.76 from bovine erythrocyte coeluted in this active fraction. Mass spectrometry analysis using the MALDI-TOF technique revealed an experimental molecular mass value of 8566 Da

(4283 Da corresponding to *z*=2), in complete agreement with the theoretical molecular mass of Ub1.76 (8565 Da) (Fig. 1B). These data indicated that free Ub was present in and released from chromaffin cells upon stimulation. In control experiments, Ub was not detectable in the extracellular medium from nonstimulated chromaffin cells (data not shown), demonstrating that Ub is not constitutively released.

Localization of Ub in the subcellular fractions of chromaffin cells

A reliable approach to demonstrate the subcellular localization of Ub in chromaffin cells was to compare its distribution with that of markers to various cell fractions separated by density gradient centrifugation. Immunomarkers to cytoplasm, granule membrane, and intragranular matrix fractions were used (Fig. 2). Bovine Ub from erythrocytes was used as a control. Subcellular fractions were characterized by immunoblotting with anti-PNMT (cytoplasm), anti-DBH (granule matrix and membrane), and anti-CGA (intragranular matrix and membrane). In bovine chromaffin granule, DBH is localized both in soluble and membrane compartments. DBH represents 5% of the soluble proteins, as measured by immunological methods, and is a major component of the membrane (33). CGA was found both in the soluble granule matrix and in the membrane in a 2/1 ratio (34).

Free Ub was immunodetected in the soluble granule fraction (line 1, lane 5), but not in the granule membrane fraction (line 1, lane 4), even at comparable concentration (50 μg). The presence of free Ub in the soluble granule compartment fits well with previous data on the recovery of Ub in secretions of stimulated chromaffin cells (Fig. 1). PNMT is a cytoplasmic marker (35), and it was not detected in the granule matrix fraction (line 2). This observation demonstrated that the intragranular matrix fraction was not contaminated with cytoplasmic material even when higher protein concentrations were applied on gels. Finally, free Ub was clearly detected in the plasma membrane fraction at higher exposure times or concentrations.

In the intragranular matrix Ub, has been quantified after Western blot by comparison with the cytoplasmic form and intragranular CGA with the PCBAS program. Free Ub present in the granular matrix was evaluated to represent 12%

of cytoplasmic Ub and ~5% of intragranular total immunoreactive CGA.

Antimicrobial activities of bovine Ub and Ub65.76

As shown in [figure 1](#), Ub-enriched HPLC fraction displays antibacterial activity. The activities of Ub from bovine erythrocytes against bacteria and fungi were then tested. Resulting data confirmed that Ub inhibits the growth of *M. luteus* and *B. megaterium* at a minimal inhibitory concentration (MIC) of 60 μM ([Table 1](#)). In addition, we noted that Ub inhibits the growth of *N. crassa* at a MIC of 60 μM , being completely killed at a concentration of 100 μM . Then, we attempted to characterize the shortest active peptide derived from Ub, after proteolytic digestion with endoproteinase Glu-C and separation on reverse-phase HPLC ([Fig. 3A](#)). We focused on the active fraction indicated by the arrow, and automatic Edman degradation revealed the presence of the sequence STLHLVLRIRGG, suggesting cleavage after Glu64 residue ([Fig. 3B](#)). MALDITOF analysis confirmed that the peptide corresponds to Ub65.76 because of its experimental molecular mass of 1322 Da ([Fig. 3C](#)).

The corresponding peptide was synthesized and tested for its antibacterial and antifungal activities against several microorganisms ([Table 1](#)). It is active against Gram-positive bacteria *M. luteus* and *B. megaterium*, with a MIC estimated to 5 and 4 μM , respectively, completely inhibiting the growth of these strains at the concentration of 10 μM . In addition, it is active against *E. coli* (SBS 363 and D22) with a MIC of 20 and 50 μM . In contrast, no activity is detectable at concentrations up to 100 μM against other Gram-positive bacteria tested so far such as *L. monocytogenes* (S47014), *S. pyogenes*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis* (QB935), and Gram-negative bacteria such as *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* (D6H), *S. typhimurium*, *A. faecalis*, and *P. aeruginosa* (ATCC 82118) (data not shown).

To complete the spectrum of the antimicrobial activity of the synthetic peptide, we also tested its ability to affect the growth of filamentous fungi and yeast cells. Interestingly, this peptide in the concentration range from 1 to 30 μM completely inhibits a variety of filamentous fungi, including *A. fumigatus*, *N. haematococca*,

F. culmorum, *F. oxysporum*, *T. mentagrophytes*, and *T. viride*, with MIC values in the micromolar range ([Table 1](#)). In addition, the synthetic peptide corresponding to Ub65.76 is active against the yeast forms of *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. neoformans*, and *C. glabrata* with a MIC varying from 15 to 20 μM . These experiments indicate a lytic effect of Ub65.76 against Gram-positive bacteria and fungi, because we could not obtain a restart of the microorganism growth after 48 h. Furthermore, as other antimicrobial peptides (36, 38), 50 μM Ub65.76 is unable to induce the lysis of sensitive mammalian cells like erythrocytes at a concentration up to 50 μM .

Synergistic effect of Ub1.34 on the antifungal activity of Ub65.76

The three-dimensional structure of Ub reveals that the residue Glu64 is located close to the N-terminal sequence surrounding the surface residue Phe4 (39). Furthermore, it has been reported that the N-terminal fragment (residues 1.34) adopts a β -hairpin (residues 1.17) followed by an α -helix (residues 23.34), which may be important for the interaction with membranes (39). We thus decided to probe the antifungal activity of Ub1.34. This peptide displays a weak activity against *N. crassa* with a MIC at 100 μM (data not shown). In contrast, when Ub1.34 (10 μM) was added to Ub65.76, the two peptides were found to act synergistically to inhibit the growth of several filamentous fungi and yeasts such as *N. crassa*, *A. fumigatus*, *T. mentagrophytes*, *T. viride*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, and *C. neoformans* ([Table 1](#)). As a typical example, the activities of various concentrations of Ub65.76 without (control experiment) and in the presence of 10 μM Ub1.34 were tested against *T. mentagrophytes* (a widespread dermatophyte associated with skin mycose) and *A. fumigatus* as illustrated in [figure 4A](#) and [4B](#), respectively. Ub65.76 was tested against *T. mentagrophytes* after incubation during 48 h at increasing concentrations from 7.5 to 35 μM , and the complete inhibition was obtained with 35 μM . Similarly, Ub65.76 was tested against *A. fumigatus* after incubation for 21 h at increasing concentrations from 15 to 50 μM , and the complete inhibition was obtained with 50 μM Ub65.76. By comparison, the complete inhibition with the mixture of the two peptides is obtained with 10 μM Ub1.34/20 μM Ub65.76 against *T. mentagrophytes* ([Fig. 4A](#)) and with 10 μM Ub1.34/25 μM Ub65.76 against *A. fumigatus*

(Fig. 4B) showing that the N-terminal fragment potentializes the effect of Ub65.76.

Confocal laser scan analysis of the interaction of Ub65.76 with *A. fumigatus*

We used confocal microscopy to analyze the interaction of the synthetic rhodamine-labeled Ub65.76R peptide with fungal membranes (Fig. 5A). The fluorescent inactive CGB602.626R peptide was used as a control (11). Before confocal laser microscopy analysis, we verified that the rhodamine-labeled Ub65.76R possesses comparable antifungal activity to that of the unlabeled peptide. *A. fumigatus* fungal spores were first incubated at 30°C for 21 h (Fig. 5A1) and then for 2 min with 1 µM Ub65.76R (Fig. 5A2). By comparison with control experiments, Ub65.76R at 1 µM was visible at the level of cell wall and in the inner compartment after 2 min of incubation, indicating that Ub65.76R is able to penetrate very quickly through cell wall. It accumulates within microorganisms, invading completely the numerous hyphae and inducing the formation of vacuoles (Fig. 5A3). The rhodaminated inactive peptide CGB602.626R (10 µM) was undetectable in *A. fumigatus* after 1 h of treatment (Fig. 5A4). However, if *A. fumigatus* was treated for 1 h with unlabeled Ub65.76 (20 µM) and CGB602.626R (10 µM), an intense fluorescence was observed indicating that Ub65.76 destabilizes the cell wall, allowing the inactive peptide to penetrate into the fungi (Fig. 5A5).

Confocal laser scan analysis of the interaction of Ub1.34 with *A. fumigatus* and *N. crassa*

A. fumigatus fungal spores were incubated at 30°C for 21 h and then for 15 min with 5 µM Ub1.34R (Fig. 5B1). By comparison with control experiment (Fig. 5A1), Ub1.34R was visible at the level of cell wall but not within cells. Increasing Ub1.34R concentrations up to 20 µM revealed that Ub1.34R is unable to penetrate into fungi. Similar data were observed with *N. crassa* (Fig. 5B2). However, when *A. fumigatus* fungal spores were treated for 45 min with unlabeled 20 µM Ub65.76 and then with 5 µM Ub1.34R for 15 min, fluorescence was observed, indicating that Ub65.76 allows the penetration of Ub1.34R because of probable membrane destabilization (Fig. 5B3).

Inhibition of calcineurin activity

In addition to the destabilization of fungal cell wall, Ub65.76 may also exert activity on

intracellular targets. It has previously been shown that CaM is mono-ubiquitinated in a Ca²⁺-dependent manner with a Ub-CaM synthetase (40). The covalent linkage occurs between the residue Lys21 of CaM and the C-terminal residue Gly76 of Ub, inducing a strong negative influence on the biological function of CaM. In addition, it has been established that calcineurin (CaN), the CaM-activated phosphatase B, plays a crucial role in hyphal growth, morphology, and maintenance of the apical Ca²⁺ gradient in the filamentous fungi *N. crassa* (41). Taken together, these observations prompted us to examine the effect of Ub65.76 and free Ub1.76 from erythrocytes on CaN phosphatase activity. As shown in figure 6, 10 µM and 50 µM Ub65.76 inhibited phosphatase activity by 43% and 85%, respectively. In similar conditions, 100 µM free Ub inhibited phosphatase activity by only 25.30%.

DISCUSSION

Ub, a protein that has been highly conserved throughout the course of evolution (13, 14), exists in cells as both free and conjugated form. It targets proteins as a signal for proteasome degradation or endocytosis. The Ub-proteasome system is recognized as a key regulatory system in basic biological processes, including cell cycle regulation, cell growth and proliferation, rapid degradation of transcriptional regulators involved in a diversity of signal transducing processes, and responses to environmental conditions, including stress response (42,44). Furthermore, in mammalian cells, Ub serves as a signal for the endocytosis of plasma membrane proteins when it is added to their N-terminal cytoplasmic domain (45).

Ub conjugated to proteins has emerged as a major modification, regulating a variety of cellular processes, including protein turnover and trafficking, endocytosis, transcriptional regulation, activation of transcriptional factors, secretion, and virus budding (46, 47). Ub is now accepted as a crucial posttranslational modification, akin to phosphorylation, that can regulate protein location and activity in various ways (16).

Exocytosis is the late stage of a broader mechanism involved in general membrane trafficking that includes membrane transport in the endoplasmic reticulum/Golgi apparatus and

endocytosis (48). The Golgi apparatus plays a large role in modifications, sorting and trafficking of proteins exported from the endoplasmic reticulum (49). Recently, it has been described from insects to mammals that a novel protein N4WBP5, associated with the Golgi complex, is a potential target for ubiquitination by the Nedd4 family Ub-protein ligase (50). The demonstration that the Nedd4 family can target a Golgi isolated protein further emphasizes the pleiotropic nature of the subcellular regulation by these ligases. In addition, a transmembrane Ub-ligase Tull1, which is resident in the Golgi apparatus, has been demonstrated to promote the ubiquitination and sorting of proteins with polar transmembrane domains into multivesicular bodies (51). On the basis of the Golgi system being the cellular compartment implicated in the granule biosynthesis, it would be interesting to examine the presence of free Ub and Ub-conjugated proteins within secretory granules.

The presence of free Ub in the soluble intragranular material and in secretions from stimulated chromaffin cells could involve a mechanism that includes sorting the free Ub and Ub-conjugated protein from the Golgi as well as deubiquitination once the protein has been packed into granule, thus releasing free Ub. In 1999, many deubiquitination enzymes were isolated from soluble and membrane-bound fractions of bovine brain (52). Furthermore, recently it has been demonstrated that soluble and membrane-bound tyrosine hydroxylase (TH) are ubiquitinated in adrenal chromaffin cells (53). In contrast to the multi/poly-Ub conjugates observed for the soluble recombinant human TH, the membrane-bound form is mono-ubiquitinated (53), which may be related to the function of the ubiquitin C-terminal hydrolase (the deubiquitination enzyme UCHL1), highly expressed in neuroendocrine cells and more particularly in rat chromaffin cells (54).

Ub may be involved in the pathogenesis of various diseases. The intracellular accumulation of Ub or Ub-protein conjugates has been detected in patients with neurodegenerative pathologies (55, 56), muscular diseases (57), brain ischemia (58), and cancers (59). Extracellular Ub has been suggested to be involved in amyloid formation (60) and growth of hematopoietic cells (61). Furthermore, several studies have revealed an endocrine role with an

increase of Ub concentration in the serum of patients with parasitic and allergic diseases (62), in the plasma of patients with chronic renal failure (63), and in cerebrospinal fluids of patients with Creutzfeldt- Jakob (64) and Alzheimer's disease (65).

In the present work, we have detected free Ub in the matrix of secretory granules of bovine chromaffin cell. Upon stimulation, free Ub is released into the extracellular medium. The release process occurs by exocytotic mechanism, because free Ub is not liberated from unstimulated cells. The presence of Ub in the granular matrix of chromaffin granules may be related to the ubiquitination of TH and other unidentified Ub conjugates of bovine adrenal chromaffin granule membrane (53). The role of ubiquitinated TH is not known, but it may be related to enzyme activity regulation or to protein fate during endocytosis that follows exocytosis (48). Ub was described to synergistically increase the production of tumor necrosis factor α in the presence of lipopolysaccharide in murine macrophage cell line RAW 264, suggesting a role in modulatory mechanisms of immune response (66). Levels of Ub and Ub-protein conjugates have been shown to be altered in response to heatshock (43) and in processes of cell development (67), differentiation (68), and aging (69). Cellular concentrations of the two forms of Ub, free Ub and multi-Ub-linked proteins, are closely linked, and they change in response to various cellular events. In heat stress situations, the ubiquitination process increases with the concomitant consumption of free Ub and ubiquitinated histones (44). In stressed chicken embryo fibroblasts, free Ub and Ub-protein conjugates increased substantially (70). These data indicate that, during cell stress, Ub plays an important role but not yet understood. More recently, it has been reported that hypoxia-ischemia induces the rapid elevation of Ub conjugate levels, a finding that has been interpreted as a neuroprotective role played by Ub (58).

We have also shown that Ub possesses antimicrobial properties. An antibacterial Ub-derived peptide isolated from rat bladder has previously been reported (71). To characterize the structural features implicated in the antimicrobial properties of Ub, we have tested several Ub-derived peptides. The C-terminal peptide Ub65.76 displays potent antifungal

activities at μM range. This cationic peptide (charge +3) includes the tail of the last four residues, Leu73, Arg74, Gly75, and Gly76, of Ub and is structured in β -strand (39). It interacts with the cell wall, crosses the fungal membrane, and accumulates in the microorganisms. In addition, we have shown that the N-terminal peptide Ub1.34 is blocked at the level of the cell wall and acts synergistically with Ub65.76, killing fungi and yeasts. Furthermore, pretreatment with Ub65.76 helps it to penetrate into microorganisms. In normal serum, the cellular concentration of free Ub from erythrocytes and immune cells (neutrophils) (72) is evaluated to 6 μM and 10 nM, respectively. Furthermore, in infectious fluids, immune cells release higher concentrations of free Ub, which might be degraded by endoproteinase Glu-C from *S. aureus*, inducing the release of Ub65.76 at concentrations corresponding to the antifungal activity. Ub65.76-derived peptide has not been isolated from intragranular matrix and secretions, but it represents, with the N-terminal sequence Ub1.34, the Ub domains important for the interaction with microorganism membranes and the antimicrobial properties.

Antifungal peptides are classified according to their mode of action. A first group acts by lysis, which occurs *via* several mechanisms, including destabilization of membranes, formation of aqueous pores, and intracellular process, whereas a second group interferes with cell wall synthesis or with the biosynthesis of glucan or chitin (73). The confocal laser microscopy analysis of the interaction of Ub65.76 with fungi shows that this peptide penetrates into the cell where it could act on intracellular targets. In addition, Ub65.76 destabilizes the fungal cell wall with the formation of holes, because the inactive peptides CGB602.626 or Ub1.34 could be recovered within fungi after incubation with Ub65.76. The crossing through the cell wall and the membrane may result in the inhibition of enzymes essential for their integrity. Along this line, CaM is required to activate chitin synthase (74). It has been demonstrated that CaM is reversibly ubiquitinated by Ub-CaM ligase in the presence of Ca^{2+} (40), inducing a strong negative effect on the activation of CaM-dependent enzymes such as CaN, known to be essential for the growth of hyphae (41) and virulence of the human yeast pathogen *C. neoformans* (75). It has been shown that CaM from *N. crassa* and yeast can be covalently

conjugated to Ub in a Ca^{2+} -dependent manner (76, 77). Our present experimental data have revealed that Ub65.76 is also able to inhibit the phosphatase activity of CaN at the same concentration range as that required to inhibit fungal growth. It might be possible that Ub65.76 interacts with CaM, similarly to chromofungin (11), to inhibit the CaM activation of enzymes important for the cell wall formation (chitin synthase) and the fungal growth (CaN). This procedure to prevent the enzyme activation by CaM might complete the inhibition of essential CaM-dependent enzymes (40) by Ub-CaM covalent complex.

It has recently been shown that Ub surface residues essential for life in *S. cerevisiae* are located around two distinct clusters (Q2, F4, T12) and (L8, R42, I44, G47, K48) and with the C-terminal tail 70.76 (V70L71R72L73R74G75G76) (78). Thus, the residues important for the different functions of Ub have been characterized: V70-G76 are crucial for conjugation; K48 is necessary for branched chain multiubiquitin adducts; the cluster L8I44V70 and the C-terminal tail V70-G76 are implicated in proteasome degradation; and the two patches (L8I44V70, Q2F4T12) and the sequence V70-G76 are important for internalization (78). Furthermore, Ub has previously been identified in several fungi and yeasts strains such as *N. crassa* (79), *T. mentagrophytes* (80), and *C. albicans* (81). The penetration of synthetic Ub65.76 into fungi and yeasts might prevent the ubiquitination/deubiquitination process, induced by the endogenous C-terminal tail Ub65.76 necessary for the life of these microorganisms, by mechanisms not yet identified. In addition, the sequence Ub1.34, which acts synergistically with Ub65.76, includes completely the first patch (Q2, F4, T12) of essential residues for yeast life, which are also required for endocytosis.

To conclude, Ub is a very highly conserved multifunctional protein. The C-terminal Ub65.76 sequence is important for recognition of Ub-conjugated proteins by the proteasome system, for internalization, and for survival in yeasts. We show for the first time that this peptide displays a potent antifungal activity due to its ability to cross microorganism cell membranes and to probably interact with molecules crucial for the growth of fungi. In addition, this activity is enhanced by the presence of the N-terminal

fragment Ub1.34. Together, these two peptides may be useful in the future as potent therapeutic antifungal agents.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by INSERM and the Université Louis Pasteur (Strasbourg, France) and supported by grants from the Ligue Contre le Cancer (to M. H. M. B. and D. A.) and the Fondation pour la Recherche Médicale (Ph.D. grant to A. E. K.). It also received financial

support from Meiji Co. Odawara, Japan. We thank Dr. H. Koenig (Hôpital Civil, Strasbourg), Dr. J. L. Dimarcq, and V. Schott (Entomed, Illkirch, France) for the gift of fungal and yeast strains and interesting discussions. We are indebted to Dr. P. Bulet and M. Schneider (CNRS, UPR 9022) for their help in antimicrobial assays. We thank Dr. L. Denoroy (INSERM U512) for the generous gift of polyclonal antibody against PNMT. We thank J. Knobloch (Faculty of Medicine, Strasbourg) for the collect of biological tissues.

REFERENCES

1. Boman, H. G. (1995) Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **13**, 61.92
2. Hoffmann, J. A., Reichhart, J. M., Hetru, C. (1996) Innate immunity in higher insects. *Curr. Opin. Immunol.* **8**, 8.13
3. Zasloff, M. (1992) Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **4**, 3.7
4. Zasloff, M. (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* **415**, 389.395
5. Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., Ezekowitz, R. A. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**, 1313.1318
6. Strub, J. M., Garcia-Sablone, P., Lonning, K., Taupenot, L., Hubert, P., Van Dorsselaer, A., Aunis, D., Metz-Boutigue, M. H. (1995) Processing of chromogranin B in bovine adrenal medulla. Identification of secretolytin, the endogenous C-terminal fragment of residues 614-626 with antibacterial activity. *Eur. J. Biochem.* **229**, 356.368
7. Strub, J. M., Goumon, Y., Lugardon, K., Capon, C., Lopez, M., Moniatte, M., Van Dorsselaer, A., Aunis, D., Metz-Boutigue, M. H. (1996) Antibacterial activity of glycosylated and phosphorylated chromogranin A-derived peptide 173-194 from bovine adrenal medullary chromaffin granules. *J. Biol. Chem.* **271**, 28533.28540
8. Goumon, Y., Lugardon, K., Kieffer, B., Lefevre, J. F., Van Dorsselaer, A., Aunis, D., Metz-Boutigue, M. H. (1998) Characterization of antibacterial COOH-terminal proenkephalin-A-derived peptides (PEAP) in infectious fluids. Importance of enkelytin, the antibacterial PEAP209-237 secreted by stimulated chromaffin cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 29847.29856
9. Metz-Boutigue, M. H., Goumon, Y., Lugardon, K., Strub, J. M., Aunis, D. (1998) Antibacterial peptides are present in chromaffin cell secretory granules. *Cell. Mol. Neurobiol.* **18**, 249.266
10. Lugardon, K., Raffner, R., Goumon, Y., Corti, A., Delmas, A., Bulet, P., Aunis, D., Metz-Boutigue, M. H. (2000) Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A. *J. Biol. Chem.* **275**, 10745.10753
11. Lugardon, K., Chasserot-Golaz, S., Kieffer, A. E., Maget-Dana, R., Nullans, G., Kieffer, B., Aunis, D., Metz-Boutigue, M. H. (2001) Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A-(47-66)-derived peptide. *J. Biol. Chem.* **276**, 35875.35882
12. Schlesinger, D. H., Goldstein, G., Niall, H. D. (1975) The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry* **14**, 2214.2218
13. Schlesinger, D. H., Goldstein, G. (1975) Molecular conservation of 74 amino acid sequence of ubiquitin between cattle and man. *Nature* **255**, 423.04
14. Cox, M. J., Shapira, R., Wilkinson, K. D. (1986) Tryptic peptide mapping of ubiquitin and derivatives using reverse-phase high performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **154**, 345.352
15. Hicke, L. (2001) Protein regulation by monoubiquitin. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 195.201
16. Hicke, L. (2001) A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* **106**, 527.530
17. Smith, A. D., Winkler, H. (1967) Purification and properties of an acidic protein from chromaffin granules of bovine adrenal medulla. *Biochem. J.* **103**, 483.492

18. Metz-Boutigue, M. H., Garcia-Sablone, P., Hogue-Angeletti, R., Aunis, D. (1993) Intracellular and extracellular processing of chromogranin A. Determination of cleavage sites. *Eur. J. Biochem.* **217**, 247.257
19. Galindo, E., Bader, M. F., Aunis, D. (1991) Regulation of Chromogranin A and Chromogranin B (Secretogranin I) Synthesis in Bovine Cultured Chromaffin Cells. *J. Neuroendocrinol.* **3**, 669.677
20. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680.685
21. Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **24**, 145.149
22. Wu, M., Hancock, R. E. (1999) Interaction of the cyclic antimicrobial cationic peptide bactenecin with the outer and cytoplasmic membrane. *J. Biol. Chem.* **274**, 29.35
23. Bulet, P., Dimarcq, J. L., Hetru, C., Lagueux, M., Charlet, M., Hegy, G., Van Dorsselaer, A., Hoffmann, J. A. (1993) A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J. Biol. Chem.* **268**, 14893.14897
24. Broekaert, W. F., Terras, F. R., Cammue, B. P., Osborn, R. W. (1995) Plant defensins: novel antimicrobial peptides as components of the host defense system. *Plant Physiol.* **108**, 1353.1358
25. Goumon, Y., Strub, J. M., Moniatte, M., Nullans, G., Poteur, L., Hubert, P., Van Dorsselaer, A., Aunis, D., Metz-Boutigue, M. H. (1996) The C-terminal bisphosphorylated proenkephalin-A-(209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity. *Eur. J. Biochem.* **235**, 516.525
26. Vorm, O., Mann, M. (1994) Improved mass accuracy in matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry of peptides. *J Am Soc Mass Spectr* **5**, 955.958
27. Vorm, O., Roepstorff, P., Mann, M. (1994) Improved resolution and very high sensitivity in MALDI-TOF of matrix surfaces made by fast evaporation. *Anal. Chem.* **66**, 3281.3287
28. Merrifield, R. B. (1963) Solid phase peptide synthesis. Synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2149.2154
29. Blumenthal, D. K., Takio, K., Hansen, R. S., Krebs, E. G. (1986) Dephosphorylation of cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit (type II) by calmodulin-dependent protein phosphatase. Determinants of substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **261**, 8140.8145
30. Martin, B., Pallen, C. J., Wang, J. H., Graves, D. J. (1985) Use of fluorinated tyrosine phosphates to probe the substrate specificity of the low molecular weight phosphatase activity of calcineurin. *J. Biol. Chem.* **260**, 14932.14937
31. Harder, K. W., Owen, P., Wong, L. K., Aebersold, R., Clark-Lewis, I., Jirik, F. R. (1994) Characterization and kinetic analysis of the intracellular domain of human protein tyrosine phosphatase beta (HPTP beta) using synthetic phosphopeptides. *Biochem. J.* **298**, 395.401
32. Goumon, Y., Lugardon, K., Gadroy, P., Strub, J. M., Welters, I. D., Stefano, G. B., Aunis, D., Metz-Boutigue, M. H. (2000) Processing of proenkephalin-A in bovine chromaffin cells. Identification of natural derived fragments by N-terminal sequencing and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* **275**, 38355.38362
33. Hortnagl, H., Lochs, H., Winkler, H. (1974) Immunological studies on the acidic chromogranin and on dopamine beta-hydroxylase (EC 1.14.2.1) of bovine chromaffin granules. *J. Neurochem.* **22**, 197.199
34. Helle, K. B. (1971) Biochemical studies of the chromaffin granule. I. Distribution of chromogranin A and dopamine beta-hydroxylase activity in the membrane and water-soluble granule fractions. *Biochim. Biophys. Acta* **245**, 80.93
35. Kelner, K. L., Pollard, H. B. (1985) Glucocorticoid receptors and regulation of phenylethanolamine-N-methyltransferase activity in cultured chromaffin cells. *J. Neurosci.* **5**, 2161.2168
36. Mor, A., Hani, K., Nicolas, P. (1994) The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. *J. Biol. Chem.* **269**, 31635.31641
37. Javadpour, M. M., Juban, M. M., Lo, W. C., Bishop, S. M., Alberty, J. B., Cowell, S. M., Becker, C. L., McLaughlin, M. L. (1996) *De novo* antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *J. Med. Chem.* **39**, 3107.3113

38. Ali, M. F., Soto, A., Knoop, F. C., Conlon, J. M. (2001) Antimicrobial peptides isolated from skin secretions of the diploid frog, *Xenopus tropicalis* (Pipidae). *Biochim. Biophys. Acta* **1550**, 81.89
39. Vijay-Kumar, S., Bugg, C. E., Wilkinson, K. D., Cook, W. J. (1985) Three-dimensional structure of ubiquitin at 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 3582.3585
40. Laub, M., Steppuhn, J. A., Bluggel, M., Immler, D., Meyer, H. E., Jennissen, H. P. (1998) Modulation of calmodulin function by ubiquitin-calmodulin ligase and identification of the responsible ubiquitylation site in vertebrate calmodulin. *Eur. J. Biochem.* **255**, 422.431
41. Prokisch, H., Yarden, O., Dieminger, M., Tropschug, M., Barthelmess, I. B. (1997) Impairment of calcineurin function in *Neurospora crassa* reveals its essential role in hyphal growth, morphology and maintenance of the apical Ca²⁺ gradient. *Mol. Gen. Genet.* **256**, 104. 114
42. Finley, D., Ozkaynak, E., Varshavsky, A. (1987) The yeast polyubiquitin gene is essential for resistance to high temperatures, starvation, and other stresses. *Cell* **48**, 1035.1046
43. Carlson, N., Rogers, S., Rechsteiner, M. (1987) Microinjection of ubiquitin: changes in protein degradation in HeLa cells subjected to heat-shock. *J. Cell Biol.* **104**, 547.555
44. Parag, H. A., Raboy, B., Kulka, R. G. (1987) Effect of heat shock on protein degradation in mammalian cells: involvement of the ubiquitin system. *EMBO J.* **6**, 55.61
45. Nakatsu, F., Sakuma, M., Matsuo, Y., Arase, H., Yamasaki, S., Nakamura, N., Saito, T., Ohno, H. (2000) A Di-leucine signal in the ubiquitin moiety. Possible involvement in ubiquitination-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 26213.26219
46. Hochstrasser, M. (1996) Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu. Rev. Genet.* **30**, 405.439
47. Weissman, A. M. (2001) Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 169.178
48. Aunis, D. (1998) Exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Int. Rev. Cytol.* **181**, 213.320
49. Glick, B. S. (2000) Organization of the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**, 450.456
50. Harvey, K. F., Shearwin-Whyatt, L. M., Fotia, A., Parton, R. G., Kumar, S. (2002) N4WBP5, a potential target for ubiquitination by the Nedd4 family of proteins, is a novel Golgi-associated protein. *J. Biol. Chem.* **277**, 9307.9317
51. Reggiori, F., Pelham, H. R. (2002) A transmembrane ubiquitin ligase required to sort membrane proteins into multivesicular bodies. *Nat. Cell Biol.* **4**, 117.123
52. Kawakami, T., Suzuki, T., Baek, S. H., Chung, C. H., Kawasaki, H., Hirano, H., Ichiyama, A., Omata, M., Tanaka, K. (1999) Isolation and characterization of cytosolic and membranebound deubiquitinating enzymes from bovine brain. *J. Biochem. (Tokyo)* **126**, 612.623
53. Doskeland, A. P., Flatmark, T. (2002) Ubiquitination of soluble and membrane-bound tyrosine hydroxylase and degradation of the soluble form. *Eur. J. Biochem.* **269**, 1561.1569
54. Kent, C., Coupland, R. E. (1989) Localisation of chromogranin A and B, met-enkephalinarg6-gly7-leu8 and PGP9.5-like immunoreactivity in the developing and adult rat adrenal medulla and extra-adrenal chromaffin tissue. *J. Anat.* **166**, 213.225
55. Mori, H., Kondo, J., Ihara, Y. (1987) Ubiquitin is a component of paired helical filaments in Alzheimer's disease. *Science* **235**, 1641.1644
56. Lowe, J., Mayer, R. J., Landon, M. (1993) Ubiquitin in neurodegenerative diseases. *Brain Pathol.* **3**, 55.65
57. Askanas, V., Serdaroglu, P., Engel, W. K., Alvarez, R. B. (1991) Immunolocalization of ubiquitin in muscle biopsies of patients with inclusion body myositis and oculopharyngeal muscular dystrophy. *Neurosci. Lett.* **130**, 73.76
58. Hayashi, T., Tanaka, J., Kamikubo, T., Takada, K., Matsuda, M. (1993) Increase in ubiquitin conjugates dependent on ischemic damage. *Brain Res.* **620**, 171.173
59. Ishibashi, Y., Takada, K., Joh, K., Ohkawa, K., Aoki, T., Matsuda, M. (1991) Ubiquitin immunoreactivity in human malignant tumours. *Br. J. Cancer* **63**, 320.322
60. Alizadeh-Khiavi, K., Normand, J., Chronopoulos, S., Ali, A., Ali-Khan, Z. (1992) Amyloid enhancing factor activity is associated with ubiquitin. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* **420**, 139.148
61. Daino, H., Shibayama, H., Machii, T., Kitani, T. (1996) Extracellular ubiquitin regulates the growth of human hematopoietic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **223**, 226.228

62. Asseman, C., Pancre, V., Delanoye, A., Capron, A., Auriault, C. (1994) A radioimmunoassay for the quantification of human ubiquitin in biological fluids: application to parasitic and allergic diseases. *J. Immunol. Methods* **173**, 93.101
63. Okada, M., Miyazaki, S., Hirasawa, Y. (1993) Increase in plasma concentration of ubiquitin in dialysis patients: possible involvement in beta 2-microglobulin amyloidosis. *Clin. Chim. Acta* **220**, 135.144
64. Manaka, H., Kato, T., Kurita, K., Katagiri, T., Shikama, Y., Kujirai, K., Kawanami, T., Suzuki, Y., Nihei, K., Sasaki, H., et al. (1992) Marked increase in cerebrospinal fluid ubiquitin in Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurosci. Lett.* **139**, 47.49
65. Kudo, T., Iqbal, K., Ravid, R., Swaab, D. F., Grundke-Iqbal, I. (1994) Alzheimer disease: correlation of cerebro-spinal fluid and brain ubiquitin levels. *Brain Res.* **639**, 1.7
66. Nabika, T., Terashima, M., Momose, I., Hosokawa, Y., Nagasue, N., Tanigawa, Y. (1999) Synergistic effect of ubiquitin on lipopolysaccharide-induced TNF-alpha production in murine macrophage cell line RAW 264.7 cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1450**, 25.34
67. Agell, N., Mezquita, C. (1988) Cellular content of ubiquitin and formation of ubiquitin conjugates during chicken spermatogenesis. *Biochem. J.* **250**, 883.889
68. Hensold, J. O., Swerdlow, P. S., Housman, D. E. (1988) A transient increase in histone H2A ubiquitination is coincident with the onset of erythroleukemic cell differentiation. *Blood* **71**, 1153.1156
69. Jahngen, J. H., Lipman, R. D., Eisenhauer, D. A., Jahngen, E. G., Jr., Taylor, A. (1990) Aging and cellular maturation cause changes in ubiquitin-eye lens protein conjugates. *Arch. Biochem. Biophys.* **276**, 32.37
70. Bond, U., Agell, N., Haas, A. L., Redman, K., Schlesinger, M. J. (1988) Ubiquitin in stressed chicken embryo fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **263**, 2384.2388
71. Wang, B., Harwig, S. S., Lehrer, R. I. (1993) Rat bladder ubiquitin-like molecule: isolation, purification and N-terminal sequencing. *Hua Xi Yi Ke Da Xue Xue Bao* **24**, 127.130
72. Takada, K., Nasu, H., Hibi, N., Tsukada, Y., Shibasaki, T., Fujise, K., Fujimuro, M., Sawada, H., Yokosawa, H., Ohkawa, K. (1997) Serum concentrations of free ubiquitin and multiubiquitin chains. *Clin. Chem.* **43**, 1188.1195
73. De Lucca, A. J., Walsh, T. J. (1999) Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1.11
74. Suresh, K., Subramanyam, C. (1997) A putative role for calmodulin in the activation of *Neurospora crassa* chitin synthase. *FEMS Microbiol. Lett.* **150**, 95.100
75. Fox, D. S., Cruz, M. C., Sia, R. A., Ke, H., Cox, G. M., Cardenas, M. E., Heitman, J. (2001) Calcineurin regulatory subunit is essential for virulence and mediates interactions with FKBP12-FK506 in *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* **39**, 835.849
76. Ziegenhagen, R., Jennissen, H. P. (1990) Plant and fungus calmodulins are polyubiquitinated at a single site in a Ca²⁺-dependent manner. *FEBS Lett.* **273**, 253.256
77. Jennissen, H. P., Botzet, G., Majetschak, M., Laub, M., Ziegenhagen, R., Demiroglou, A. (1992) Ca²⁺-dependent ubiquitination of calmodulin in yeast. *FEBS Lett.* **296**, 51.56
78. Sloper-Mould, K. E., Jemc, J. C., Pickart, C. M., Hicke, L. (2001) Distinct functional surface regions on ubiquitin. *J. Biol. Chem.* **276**, 30483.30489
79. Taccioli, G. E., Grotewold, E., Aisemberg, G. O., Judewicz, N. D. (1989) Ubiquitin expression in *Neurospora crassa*: cloning and sequencing of a polyubiquitin gene. *Nucleic Acids Res.* **17**, 6153.6165
80. Kano, R., Nakamura, Y., Watanabe, S., Hasegawa, A. (1999) Repeated ubiquitin genes in Trichophyton mentagrophytes. *Curr. Microbiol.* **39**, 302.305
81. Sepulveda, P., Cervera, A. M., Lopez-Ribot, J. L., Chaffin, W. L., Martinez, J. P., Gozalbo, D. (1996) Cloning and characterization of a cDNA coding for *Candida albicans* polyubiquitin. *J. Med. Vet. Mycol.* **34**, 315.322

Received September 4, 2002; accepted December 31, 2002.

Table 1 Antimicrobial activity of bovine Ub₁₋₇₆ and of synthetic peptide Ub₆₅₋₇₆ without and with 10 μ M Ub₁₋₃₄^a

	Ub1-76	Ub65-76 MIC (μ M)	Ub65-76 + 10 μ M Ub1-34
Species			
Gram-positive bacteria			
<i>M. luteus</i>	60	5	5
<i>B. megaterium</i>	60	4	3
Gram-negative bacteria			
<i>E. coli</i> SBS363		20	20
<i>E. coli</i> D22		50	50
Filamentous fungi			
<i>N. crassa</i>	60	10	4
<i>A. fumigatus</i>		30	15
<i>N. haematococca</i>		1	-- ^b
<i>F. culmorum</i>		4	--
<i>F. oxysporum</i>		4	--
<i>T. mentagrophytes</i>		20	7
<i>T. viride</i>		10	7
Yeast cells			
<i>C. albicans</i>		15	7
<i>C. tropicalis</i>		15	7
<i>C. glabrata</i>		20	10
<i>C. neoformans</i>		15	7

^aMIC in μ M is the minimal concentration inhibiting bacterial and fungal growth in the standardized conditions as described in Materials and Methods.

^b--, not determined.

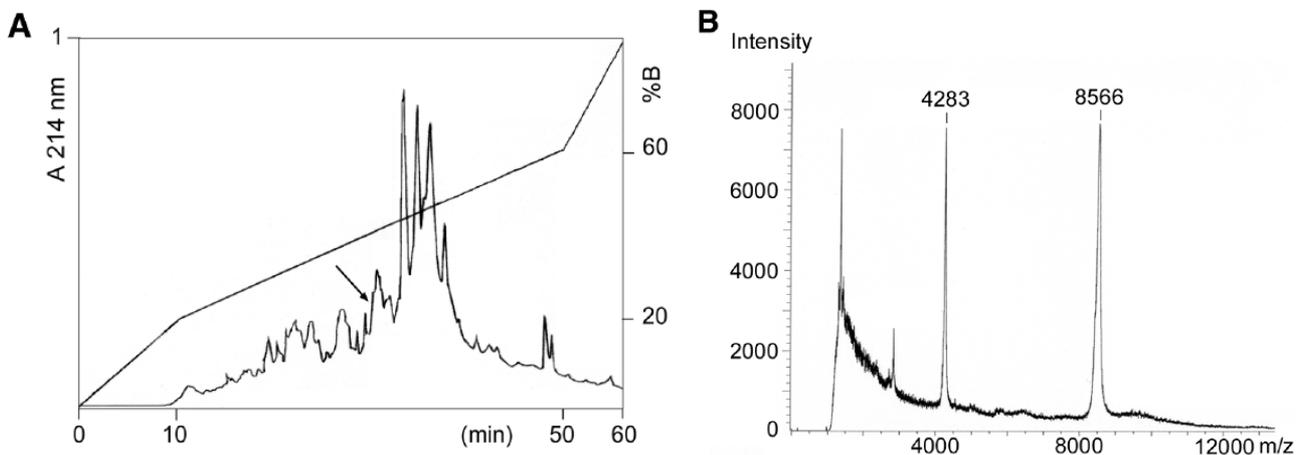


Figure 1. Isolation on HPLC of Ub from secretions of bovine-stimulated chromaffin cells. A) Chromaffin cells (2×10^8) in culture were stimulated with 20 μ M nicotine. Secreted proteins and peptides (200 μ g) were separated on a Macherey Nagel reverse-phase C18 column (4x250 mm). The solvent system consisted of 0.1% trifluoroacetic acid in water (solvent A) and 0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile (solvent B). Elution was performed with a linear gradient as indicated on the right-hand scale, and absorbance was monitored at 214 nm. Material displaying antibacterial activity against *Micrococcus luteus* and indicated with the arrow was submitted to mass spectrometry analysis. **B)** MALDI-TOF analysis of secreted Ub recovered in HPLC fraction. The experimental molecular mass value of 8566 Da (4283 Da with $z=2$) corresponds to the molecular mass of Ub.

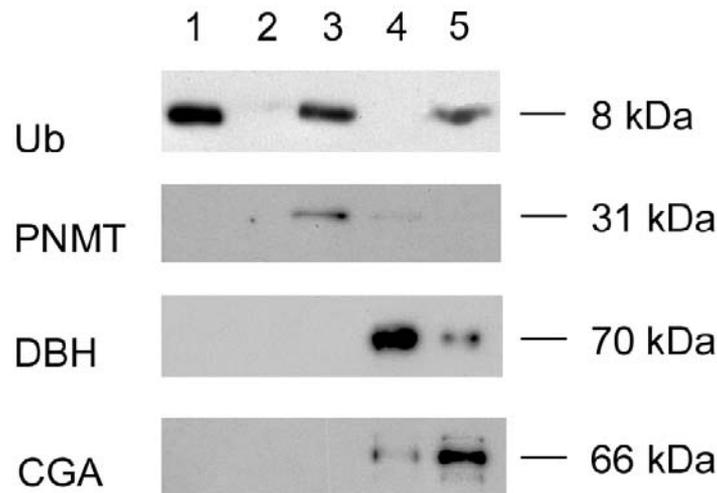


Figure 2. Western blot analysis of chromaffin cell subcellular fractions. Proteic material from subcellular chromaffin cell fractions was quantified by Bradford assay, and aliquots of the soluble material from plasma membrane (line 1, lane 2; 15 μ g), cytoplasm (line 1, lane 3; 30 μ g), granule membrane (line 1, lane 4; 50 μ g), and intragranular matrix (line 1, lane 5; 50 μ g) were separated by 17% acrylamide SDS-PAGE and electrotransferred onto a PVDF sheet. Immunodetection was carried out with polyclonal anti-bovine Ub (diluted 1:100) (line 1). The immunoreactivity at 8 kDa corresponds to whole Ub from bovine erythrocyte (line 1, lane 1; 0.15 μ g). In parallel, immunodetection was performed with antibodies specific to proteins markers: PNMT for cytoplasm (line 2, lane 3, 31 kDa), DBH for granule membrane (line 3, lane 4, 70 kDa), and CGA for intragranular matrix (line 4, lane 5, 66 kDa).

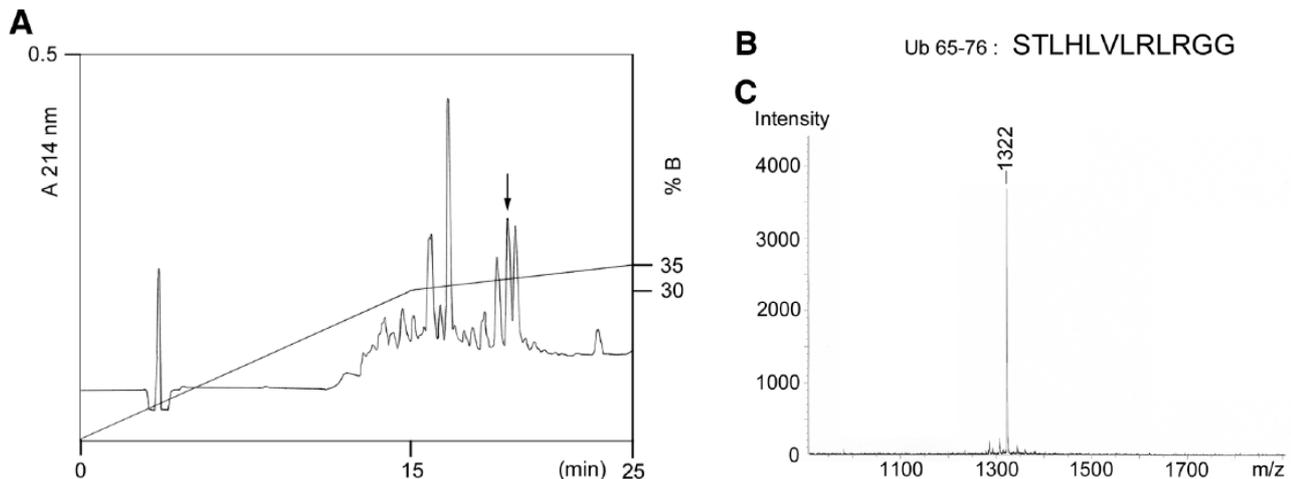


Figure 3. Separation by HPLC of Ub-derived peptides, and mass spectrometry analysis of the antimicrobial Cterminal Ub-derived peptide. **A)** Ub digest with endoproteinase Glu-C was separated on a Macherey Nagel reversephase C18 column (4x250 mm). The solvent system consisted of 0.1% trifluoroacetic acid in water (solvent A) and 0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile (solvent B). Elution was performed with a linear gradient as indicated on the right-hand scale, and absorbance was monitored at 214 nm. Arrow indicates the fraction corresponding to the antimicrobial peptide Ub65-76. **B)** Sequence of Ub65-76. **C)** Mass spectrometry analysis of material present in fraction indicated with the arrow in A.

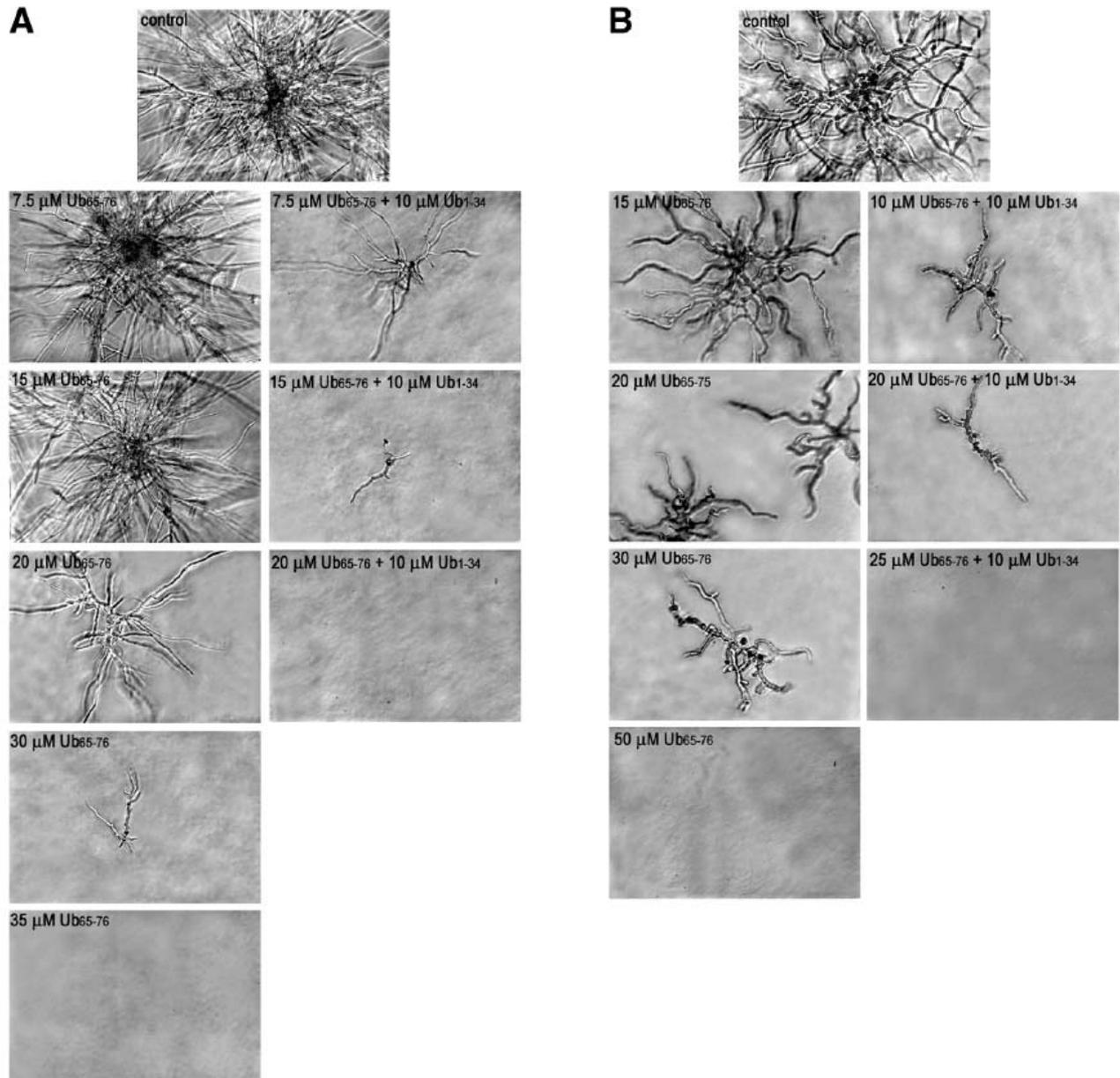


Figure 4. Inhibition of fungal growth by the synthetic peptides Ub65-76 and Ub1-34. Phase-contrast photomicrographs were taken after 48 h incubation of *Trichophyton mentagrophytes* (A) and after 21 h incubation of *Aspergillus fumigatus* (B). For each experiment, a control of the fungal growth is obtained without peptide addition. Increasing concentrations of Ub65-76 (7.5–35 μM) and (15–50 μM) were tested against *T. mentagrophytes* and *A. fumigatus*, respectively. Similar experiments were obtained in the presence of 10 μM Ub1-34. Magnification, x32.

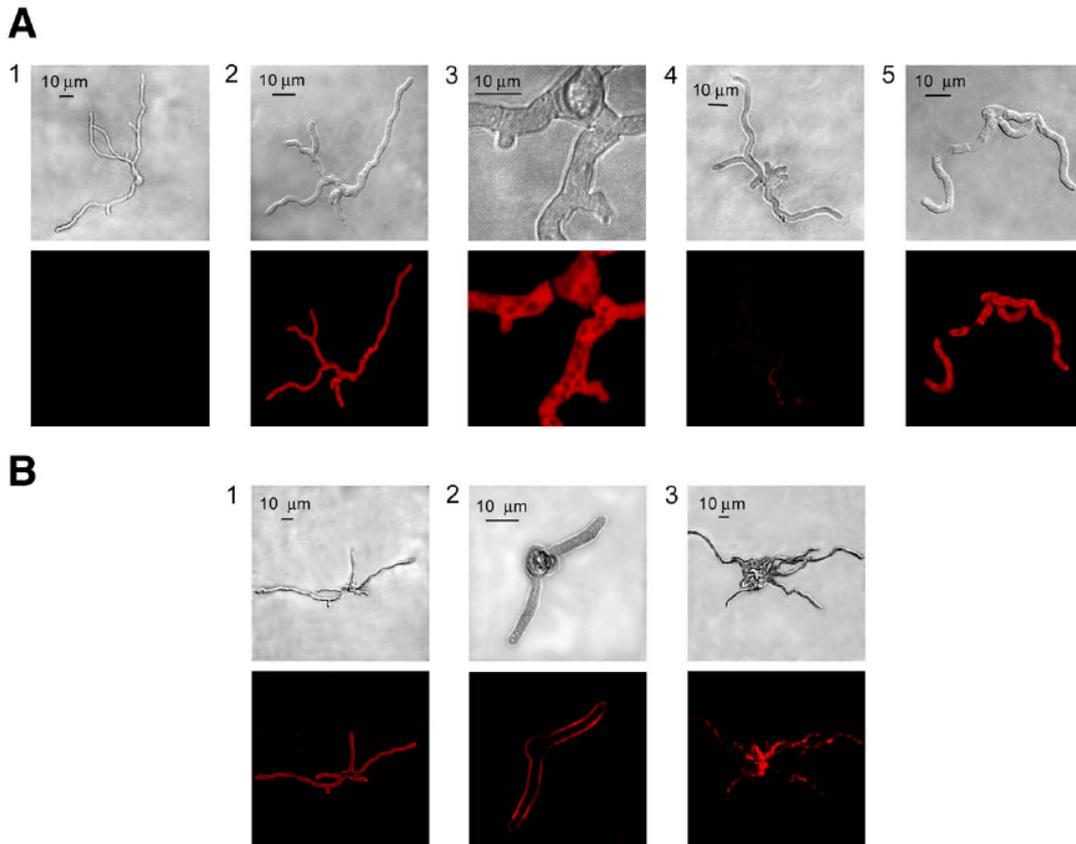


Figure 5. Phase-contrast and fluorescence confocal laser micrographs of fungi in the presence of rhodaminated synthetic peptide Ub65-76R and Ub1-34R. **A)** *Aspergillus fumigatus* was examined after 21 h in cultured medium (30°C) in the absence of rhodamine-labeled synthetic peptide (1); after incubation with 1 μM Ub65-76R for 2 min (2); at a high magnification, the core of the fungi and unlabeled vacuoles are visible, and we noted the absence of fluorescence on the septum separating two cells (3); after incubation with 10 μM CGB602-626R for 1 h (4); and after treatment with 20 μM Ub65-76 and 10 μM CGB602-626R for 1 h (5). **B)** *A. fumigatus* was examined after 21 h in cultured medium (30°C) and then was incubated with 5 μM Ub1-34R for 15 min (1); *Neurospora crassa* was examined after 23 h in cultured medium (30°C) and was then incubated with 5 μM Ub1-34R for 15min (2), and *A. fumigatus* was examined after 21 h in cultured medium (30°C) and after a first treatment with 20 μM Ub65-76 for 45 min followed by incubation with 5 μM Ub1-34R for 15 min (3).

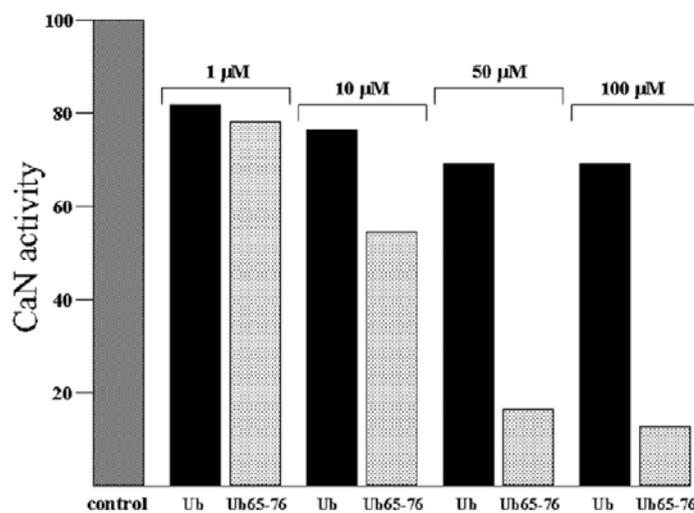


Figure 6. Effect of Ub and Ub65-76 peptide on CaN phosphatase activity. Calcineurin phosphatase activity was examined as described in Materials and Methods. Ub displayed a nonsignificant effect on CaN phosphatase activity while Ub65-76 at 50 μM inhibited the activity by 85%. These data are representative of a typical experiment.

Liste des communications

- 2ème Japan Society for the Promotion of Science congrès, Strasbourg Novembre 2002 poster : Characterization and location of posttranslational modifications on chromogranin B from bovine adrenal medullary chromaffin granules, **Claire Gasnier**, Karine Lugardon, Dominique Aunis et Marie-Hélène Metz-Boutigue
- 12ème International Symposium on Chromaffin Cell Biology, Isla de La Palma Septembre 2003 poster : Chromogranin B : characterization of its multiple posttranslational modifications and new role in Creutzfeld-Jacob disease, **Claire Gasnier**; Séphane Haïk; Karine Lugardon; Baptiste A. Fauchoux; Françoise Fieville; Jean-Jacques Hauw; Dominique Aunis et Marie-Hélène Metz-Boutigue
- Société Française de Spectrométrie de Masse, Strasbourg 2004 poster : Caractérisation et localisation des modifications post-traductionnelles de la Chromogranine B bovine, **Claire Gasnier**, Jean-Marc Strub, Dominique Aunis et Marie-Hélène Metz-Boutigue
- Congrès Neurex, Strasbourg Avril 2005, poster : Characterization and location of posttranslational modifications on chromogranin B from bovine adrenal medullary chromaffin granules, **Claire Gasnier**, Jean-Marc Strub, Dominique Aunis et Marie-Hélène Metz-Boutigue
- 7ème colloque de la Société des Neurosciences, Lille Mai 2005, poster : The implication of granins in neuroimmunity : new antimicrobial peptides derived from CGA and SgII; Characterization of secreted fragments in human serum of patients with severe sepsis, Jenny Briolat*, **Claire Gasnier***, Dan Zhang*, Thierry Lavigne, Francis Schneider, Dominique Aunis et Marie-Hélène Metz-Boutigue. (* égale contribution)
- Congrès Neurex, Bâles Avril 2006, poster : Characterization and location of posttranslational modifications on secretogranin II from bovine adrenal medullary

chromaffin granules, **Claire Gasnier**, Dominique Aunis et Marie-Hélène Metz-Boutigue

- Congrès Neurex, Bâles Avril 2006, poster : New structural and functional aspects of chromogranins, Peiman Shooshtarizadeh, **Claire Gasnier**, François Delalande, Dominique Aunis et Marie-Hélène Metz-Boutigue

Nouvelles données sur les relations structure/fonction des chromogranines et leurs applications

Les chromogranines sont une famille de protéines présentes dans les vésicules de sécrétion de nombreuses cellules endocrines, neuroendocrines et nerveuses. Elles sont porteuses de modifications post-traductionnelles et subissent une maturation protéolytique qui génère de nombreux peptides dérivés. Dans une première partie, mes recherches ont permis de caractériser 18 phosphorylations, un pont disulfure, 3 pyroglutamylations, 2 O-glycosylations et une N-glycosylation pour la chromogranine B (CGB). La détermination de ces modifications constitue un apport important dans la connaissance de cette protéine et la caractérisation de ses activités biologiques. Dans une seconde partie, je présente les modifications post-traductionnelles et la maturation protéolytique de la sécrétogranine II (SgII), granine minoritaire, mais importante dans les systèmes nerveux, endocrine et immunitaire. Cette étude est suivie par la caractérisation de deux nouveaux peptides à activité antibactérienne et antifongique dérivés de la SgII. Ces peptides pourraient être de nouveaux outils dans la lutte contre les infections, par greffage dans des nanostructures : des films actifs de polyélectrolytes. Dans une dernière partie, je présente un exemple d'application de cette technique avec l'utilisation d'un peptide antifongique dérivé de la CGA (la chromofungine) pour lutter contre les candidoses sous-prothétiques. Cette étude ouvre de nombreuses applications cliniques intéressantes.

Mots clefs : Chromogranine, sécrétogranine II, peptides antimicrobiens, modifications post-traductionnelles, nanostructures, analyse protéomique

New data on structure/function relations of chromogranins and their applications

Chromogranins constitute a protein family present in secretory vesicles of numerous endocrine, neuroendocrine and nervous cells. These proteins contain post-translational modifications and are processed within the granules into peptides. In a first part, my thesis reports the characterization of 18 phosphorylations, a disulphide bridge, 3 pyroglutamylations, 2 O-glycosylations and 1 N-glycosylation for chromogranin B (CGB) protein. The determination of these modifications is important for the knowledge of this protein and the characterization of its biological activities. In the second part, I present the post-translational modifications and the processing of the secretogranin II (SgII) protein, a minor granin, but an important protein in the nervous, endocrine and immune systems. This characterization is followed by the characterization of two new antibacterial and antifungal peptides derived from SgII. These peptides might be new anti-infectious agents, by grafting on surfaces thanks to active polyelectrolytes films. In a last part, I present an example of application of this technique with the use of an antifungal peptide derived from CGA (chromofungin) against under-prosthetic candidosis. This study opens many interesting clinical applications.

Key words: Chromogranin, secretogranin II, antimicrobial peptide, post-translational modifications, polyelectrolytes films, proteomic analysis