

UNIVERSITE LOUIS PASTEUR – STRASBOURG I

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

THESE

Présentée par

Peiman SHOOSHTARIZADEH

En vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LOUIS PASTEUR DE STRASBOURG

**Nouvelles données biologiques et structurales des chromogranines A et B :
implication dans le mécanisme d'ubiquitination et dégradation
protéolytique par l'endoprotéase Glu-C de *Staphylococcus aureus***

Soutenue le 3 Octobre 2008 devant la commission d'examen :

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

M Philippe BULET (Rapporteur externe)

M Michel SIMONET (Rapporteur externe)

M Burkhard BECHINGER (Rapporteur interne)

M Dominique AUNIS (Examineur)

Mme Jaroslava CIESIELSKI (Examineur)

À mes parents

À mes soeurs

À elle qui viendra un jour

Je dédie affectueusement ma thèse

Remerciements

Je tiens à remercier Dominique AUNIS, directeur de l'unité Inserm U575 pour m'avoir accordé de réaliser ma thèse dans son unité et pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de ma thèse.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Marie-Hélène METZ-BOUTIGUE, mon directeur de thèse, pour avoir encadré ce travail de thèse, avec beaucoup de compétence, d'enthousiasme et de disponibilité. Merci pour ses conseils, son optimisme et la confiance qu'elle m'a accordée au cours de ces années.

Je remercie chaleureusement messieurs Michel SIMONET, Philippe BULLET et Burkhard BECHINGER d'avoir bien voulu me faire l'honneur d'accepter d'être rapporteurs de ma thèse.

Mes remerciements vont également à Madame Jaroslava CIESIELSKI pour la gentillesse qu'elle a manifestée à mon égard durant cette thèse, pour tous les conseils et aussi pour m'avoir fait l'honneur de participer au Jury de soutenance.

Je remercie Iraj AMRI, gérant de la société ALTERGEN à Strasbourg pour son soutien et aide.

Je remercie Youssef HAIKEL, le Doyen de la Faculté Dentaire de Strasbourg pour avoir financé une partie de ma thèse.

Je remercie également la société allemande BRAHMS pour le financement dont j'ai profité au cours de ma thèse.

Je remercie tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est : aussi bien par les discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec eux, leurs suggestions ou contributions. Je pense ici à Dominique BAGNARD, Gille PREVOST, Daniel KELLER.

Je souhaite également remercier vivement Jean-François CHICH pour sa précieuse aide sur la mise en page du manuscrit de la thèse. Merci pour sa patience, son calme et son sens de l'humour.

Je remercie aussi Bernard GUEROLD pour les peptides synthétiques, sa gentillesse, sa générosité et sa passion pour la musique classique.

Je tiens à adresser mes vifs et sincères remerciements à Corinne TADDEI pour sa gentillesse et son amitié.

Je tiens également à remercier mes amis Yannick pour les réponses à nos questions qu'il avait toujours dans sa poche, Arnaud pour avoir bouffé mes stylos, Dan pour son humeur orientale, Elise pour ses cookies, Claire pour ses regards par dessus ses lunettes, Antonella pour ses *expresso forte*, Perrine pour son overcoat américain, Charlotte pour son charme et sa confirmation journalière concernant mon interrogation quotidienne sur ma beauté, Alexis pour sa danse unique, Eva pour son rizotto cramé et Catherine pour sa voie *Piafeuse*.

Un grand merci à toute l'équipe du l'U575, pour son accueil chaleureux durant ces années, qui a su créer une ambiance très sympathique d'entraide.

Je n'oublierai pas la gentillesse de ma famille à Strasbourg, Iraj, Rosita, Kouroush, Shahla, Sousan et Lola, ce qui a adouci l'éloignement de mon pays.

Enfin, une pensée émue et profonde pour mes parents Diana et Behrouz, mes soeurs Pantea et Parmis et mes grands parents Iran, Mossi, Nasrollah et Taj.

Table des matières

Abréviations	1
1 Le Système Immunitaire	9
1.1 Introduction	9
1.2 Réponse immunitaire innée	10
1.2.1 Présentation	10
1.2.2 Composants de l'immunité innée	11
1.3 Interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative et leur relation lors d'une infection	21
1.4 Relations entre le système immunitaire inné et le système nerveux	24
1.4.1 Contrôle du SNS sur l'immunité	24
2 Les peptides antimicrobiens (PAMs)	29
2.1 Introduction	29
2.2 Classification des PAMs	30
2.3 Genèse des PAMs	32
2.4 Aspects structuraux des PAMs	33
2.4.1 Propriétés physico-chimiques des PAMs	33
2.4.2 Structure primaire	35
2.4.3 Modifications post-traductionnelles	35
2.4.4 Structure secondaire	35
2.5 Spectre anti-infectieux des PAMs	36
2.5.1 L'activité anti-bactérienne	36
2.5.2 L'activité antifongique	39
2.5.3 L'activité antivirale	40
2.5.4 L'activité antiparasitaire	43
2.6 PAMs et peptides vecteurs (<i>Cell Penetrating Peptides</i>)	43
2.7 Résistance des micro-organismes aux PAMs	43
2.8 Activités immunomodulatrices des PAMs	45
2.8.1 Propriétés anti-endotoxines des PAMs	46
2.8.2 Les propriétés chimiotactiques des PAMs	46

2.8.3	L'orchestration des fonctions de l'immunité innée par les PAMs	46
2.8.4	Rôle des PAMs dans l'immunité adaptative	48
2.8.5	Les PAMs en tant qu'agents anti-cancer	49
2.9	Les PAMs dans les pathologies	50
2.9.1	Rôles des PAMs dans l'angiogenèse et la cicatrisation	52
2.10	Les peptides synthétiques, ou <i>designed</i>	52
2.11	Le futur des PAMs	53
2.12	Les applications thérapeutiques des PAMs	54
3	Les chromogranines A et B	57
3.1	Introduction	57
3.2	Les granules de sécrétion des cellules chromaffines	58
3.3	La famille des granines	63
3.4	Modifications post-traductionnelles	65
3.5	Structure primaire des chromogranines	66
3.5.1	La CGA	66
3.5.2	La CGB	68
3.6	Localisation des chromogranines	69
3.7	Fonctions biologiques des chromogranines	70
3.7.1	Fonctions intracellulaires des chromogranines	70
3.7.2	Fonctions extracellulaires des chromogranines	71
3.8	Peptides antimicrobiens dérivés des chromogranines	73
4	Découverte de l'ubiquitine et des protéines apparentées	75
4.1	Activation et liaison des Ub1 aux substrats	75
4.2	Polymères d'ubiquitine et Ubl	78
4.2.1	Chaînes atypiques de l'ubiquitine	79
4.2.2	Reconnaissance de chaînes d'ubiquitine par les domaines de substrat se liant à l'ubiquitine	80
4.3	Dégradation des substrats polyubiquitinés par le protéasome	81
4.3.1	Le protéasome 26S	81
4.3.2	Reconnaissance des substrats ubiquitinés par le protéasome	82
4.4	Ubiquitine et endocytose	82
4.5	Ubiquitine et autres rôles biologiques	84
4.6	Ubiquitine et pathologies	85
4.6.1	Cancer	85
4.6.2	Infection	86
4.6.3	Maladies neurodégénératives	86
4.7	Rôles de l'ubiquitine dans l'immunité	86
4.7.1	Réponse immunitaire innée	87

4.7.2	Réponse immunitaire adaptative	87
5	Matériels et méthodes	89
5.1	Préparation du matériel biologique	89
5.1.1	Isolement des protéines solubles de la matrice intragranulaire des cellules chromaffines	89
5.1.2	Dosage protéique	90
5.2	Synthèse peptidique	90
5.2.1	Peptides synthétiques non modifiés	90
5.2.2	Peptides synthétiques rhodaminés	91
5.2.3	Peptides synthétiques avec un pont disulfure	91
5.2.4	Peptide branché	91
5.3	Chromatographie HPLC de phase inverse	91
5.3.1	Préparation de l'échantillon	92
5.3.2	Préparation de la phase mobile	92
5.3.3	Séparation	92
5.4	Chromatographie d'affinité	93
5.4.1	Fixation des anticorps sur la colonne d'affinité	93
5.4.2	Purification de l'échantillon	93
5.4.3	Dessalage des échantillons	94
5.5	Électrophorèse monodimensionnelle sur gel de polyacrylamide	94
5.5.1	Coloration des protéines au bleu de Coomassie	95
5.5.2	Electrotransfert et immunodétection	95
5.6	Analyses protéomiques	96
5.6.1	Séquençage peptidique	96
5.6.2	Spectrométrie de masse MALDI-TOF	96
5.7	Caractérisation des protéines ubiquitinées par nano LC/MS/MS	97
5.8	Caractérisation des activités biologiques	98
5.8.1	Activité bactérienne	98
5.8.2	Activité antifongique	98
5.8.3	Activité antiplasmodiale	99
5.8.4	Activité hémolytique	99
5.9	Digestion protéolytique par l'endoprotéase Glu-C de <i>Staphylococcus aureus</i> V8	100
5.10	Microscopie confocale	100
5.11	Vidéomicroscopie en temps réel	101
5.12	Technique Bio-Plex®	101
5.12.1	Couplage des anticorps de capture aux microbilles	102
5.12.2	Biotinylation des anticorps de détection	102

5.12.3	Caractérisation de l'association entre l'ubiquitine et CGA au niveau de la membrane des granules chromaffines	103
5.13	Méthodes bioinformatiques	103
6	Publications	105
6.1	Introduction au manuscrit n°1	105
6.2	Introduction au manuscrit n°2	107
7	Conclusions et perspectives	109
8	Liste des publications	113
9	Liste des communications	115
	Bibliographie	117
	Annexes	145

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AMP : Adénosine MonoPhosphate
AMPK : AMP-activated Protein Kinase
ANT 1 : Adenine Nucleotide Translocator 1
APLT : AminoPhosphoLipid transporter
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : ARN messenger
ATP : Adénosine TriPhosphate
CGA : Chromogranine A
CGB : Chromogranine B
CGD : Chronic Granulomatose Disease
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMI : Concentration Minimale Inhibitrice
CPAs : Cellules Présentatrices des Antigènes
CPPs : Cell-Penetrating Peptides
CRP : C-Reactive Protein
CSP : Cysteine String Protein
ECL : ElectroChemoLuminescence
EDC : 1-Ethyl-3- (3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
ERK1/2 : Extracellular-signal-Regulated Kinase-1/2
Fmoc : 9-FluorenylMethOxyCarbonyl
FPRL1 : N-Formyl Peptide Receptor-Like 1
GAGs : GlycosAminoGlycanes
G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor
HBx : Hepatitis B virus x interacting
hCAP-18 : human Cathelicidin Antimicrobial Protein-18
HECT : Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus
HPLC : High Performance Liquid Chromatography
HSV : Herpes Simplex Virus

IFN : Interféron
IKK : $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ Kinase
IL : InterLeukine
IP3 : Inositol-3-Phosphate
kDa : Kilo Dalton
LC/MS : Liquid Chromatography/Mass Spectrometry
LDCVs : Large Dense Core Vesicles
LDH : Lactate Déshydrogenase
LPG : LysylPhosphatidylGlycerol
LPS : LipoPolySaccharide
MADH : Malate Dehydrogenase
MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight
MAMP : Microbe Associated Molecular Pattern
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases
MHB : Muller-Hinton-Broth
MIC : Minimal Inhibitory Concentration
MIR-1 : Modulator of Immune Recognition-1
MMP : Matrix MetalloProteinases
ND : Non Déterminé
NEMO : NF- κ B Essential Modulator
NESP55 : NeuroEndocrine Secretory Protein 55
NETs : Neutrophil Extracellular Traps
NF κ B : Nuclear Factor κ B
NGF : Nerve Growth Factor
NK : Natural Killer
NOD : Nucleotide-binding Oligomerization Domain
NPAMs : PAMs dérivés des Neuropeptides
NPY : NeuroPeptide Y
PAMP : Pathogen Associated Molecular Pattern
PAMs : Peptides AntiMicrobiens
PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDB : Potato Dextrose Broth
PLA2 : PhosphoLipase A2
PLD : PhosphoLipase D
PM : Poids Moléculaires
PMG : Protéines Membranaires des Granules chromaffine
PNMTase : Phenylethanolamine N-MethylTransferase
PRBP : Plasma Retinol-Binding Protein
PRR : Pattern Recognition Receptors
PSG : Protéines Solubles des Granules

PTH : PhénylThioHydantoine
PVDF : PolyVenyldine DiFluoride
RANTES : Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted (ancien nom de la chimiokine CCL5)
RING : Really Interesting New Gene
SAP : Serum Amyloid Protein
SAP-1 : cerebroside Sulfate Activator Protein
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SDS-PAGE : Sodium Dodécyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
Sg : Sécretogranine
SNC : Système Nerveux Central
S-NHS : Sulfo-N-Hydroxy Succinimide
SNP : Système Nerveux Parasymphatique
SNS : Système Nerveux Sympathique
STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TAB1 : TAK1 binding protein 1
TAK1 : TGF- β Activated Kinase
TCR : T Cell Receptor
TER : Transitional Endoplasmic Reticulum
TFA : Acide TriFluoroAcétique
TIMP-1 : Tissue Inhibitor of MetalloProteinase 1
TLR : Toll-Like Receptor
TNF : Tumor Necrosis Factor
TRAF6 : TNF- α Receptor Associated Factor 6
TrkA : Tyrosine kinase A
UBA : Ubiquitin-Associated Domain
UBDs : Ubiquitin Binding Domains
Ubl : Ubiquitin-like protein
UEV : Ubiquitin-conjugating Enzyme E2 Variant
UIM : Ubiquitin-Interacting Motif
ULP : Ubl-specific Protease
VAT 2 : synaptic vesicle monoamine transporter
V-ATPase : Vacuolar ATPase accessory subunit B
VDCC : Voltage-Dependent Calcium Channels
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Table des figures

1	Immunité innée et ses composants au cours de l'évolution	11
2	La phagocytose	15
3	Autophagie	17
4	Les 4 sous-familles de chimiokines	19
5	Effets des glucocorticoïdes sur les cellules immunitaires	26
6	Les structures prototypiques des PAMs classiques	32
7	Représentation de la cathélicidine humaine (hCAP-18)	33
8	Les modèles de perméabilisation membranaire par les peptides antibactériens	38
9	Modes d'action intracellulaires de l'activité antibactérienne des PAMs .	39
10	Propriétés anti-infectieuses des PAMs	47
11	Les différents rôles des défensines	48
12	Vue antérieure des glandes surrénales	58
13	Cellules chromaffines	59
14	Représentation des différents systèmes fonctionnels des protéines présents au sein des granules chromaffines	65
15	Localisation sur la séquence de la CGA bovine des modifications post-traductionnelles et des peptides actifs	66
16	Localisation sur la séquence de la CGA humaine des modifications post-traductionnelles et des peptides actifs	67
17	Localisation sur la séquence de la CGB bovine des modifications post-traductionnelles, des sites dibasiques et des peptides dérivés	68
18	La voie de liaison d'Ubl au substrat	77
19	Représentation schématique des modèles possibles de formation de chaînes d'ubiquitine sur la protéine cible	79
20	Régulation des protéines contenant UBD (domaine se liant à l'ubiquitine) par auto-ubiquitination	81
21	L'ubiquitine est impliquée dans la voie de l'endocytose	83

22	L'ubiquitination est un régulateur majeur de la voie de signalisation du NF- κ B	85
23	Caractérisation de l'association de l'ubiquitine et la CGA par la technique du Bio-Plex [®]	102

Liste des tableaux

I	Les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) et les récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRR) de l'immunité innée	12
II	Les médiateurs libérés par la cellule épithéliale du système respiratoire .	14
III	Certaines caractéristiques des cytokines principales de l'immunité innée	20
IV	Agonistes des molécules TLR humaines	22
V	Les différentes classes de peptides antimicrobiens	31
VI	Exemples choisis de peptides antibactériens	37
VII	Exemples choisis de peptides antifongiques	40
VIII	Exemples choisis de peptides antiviraux	41
IX	Séquence et propriétés de quelques peptides vecteurs	44
X	PAMs possédant une activité anti-cancéreuse	49
XI	Expression et fonction potentielle des PAMs lors de différentes maladies inflammatoires	51
XII	Peptides et peptido-mimétiques en cours de développement commercial	55
XIII	Les catégories fonctionnelles de protéines présentes dans les fractions solubles et/ou membranaires des granules chromaffines	60
XIV	Propriétés physico-chimiques des chromogranines	64
XV	Peptides antimicrobiens dérivés des CGs	73
XVI	Représentation de la famille des Ubls.	76
XVII	Conditions d'utilisation des anticorps lors des Western blot	96

Le système immunitaire

1 Le Système Immunitaire

1.1 Introduction

Le système immunitaire est un ensemble coordonné d'éléments qui permet de discriminer le *soi* du *non-soi*. Il agit comme un mécanisme de défense contre les pathogènes, tels que les virus, les bactéries, les parasites, mais aussi les cellules cancéreuses, certaines particules ou molécules étrangères (dont certains poisons). Le mot immunité vient du latin *immunitas* (exempté de charge). Razi (Zakaria) un scientifique pluridisciplinaire perse (865–925 Av. J.–C.) a donné la première description clinique de l'immunité en parlant d'une reconnaissance persistante après une première exposition à la variole ou à la rougeole, il n'employa toutefois pas le terme immunité (Silverstein, 1989).

Lors de la rencontre avec un pathogène, l'immunité innée, première ligne de défense de l'organisme, est mise en œuvre (Abbas et Lichtman, 2005). Il s'agit des mécanismes cellulaires et biochimiques de défense, qui sont opérationnels dès le début de l'infection. Ces mécanismes sont spécifiques de certains motifs communs des microbes et ne réagissent pas contre les substances non infectieuses. Les substances étrangères qui provoquent cette réponse immunitaire ou qui sont la cible de cette réponse, s'appellent antigènes. Les composantes de l'immunité innée ne sont pas capables de distinguer de faibles différences entre des antigènes homologues.

En plus de l'immunité innée, il existe d'autres types de réponses immunitaires qui sont stimulées par les agents infectieux et qui sont augmentées (amplitude de la réponse et capacité défensive), suite à des expositions successives à un microbe particulier. Cette forme de l'immunité n'est pas immédiate, se développe et s'adapte à l'infection, c'est pour cela qu'elle est nommée immunité adaptative et parce que ce système est induit par la rencontre avec les antigènes, on lui attribue le nom d'immunité acquise. L'immunité adaptative est capable de reconnaître et de réagir contre un grand nombre de substances microbiennes et non microbiennes. Parce qu'elle possède une capacité extraordinaire à discriminer finement les différents microbes et molécules, même dans le cas de forte ressemblance, on la qualifie d'immunité spécifique. L'immunité adaptative a deux bras principaux, l'immunité humorale et l'immunité cellulaire. L'immunité humorale agit contre les bactéries et les virus dans les liquides du corps humain (tels que le sang et le mucus). Ses principaux moyens d'action sont les immunoglobulines, aussi appelées

anticorps, produites par les lymphocytes B. L'immunité cellulaire cible les cellules infectées par des virus, bactéries, et les cellules cancéreuses par l'action des lymphocytes T. En effet, l'immunité cellulaire est efficace pour éliminer les microbes qui demeurent dans les phagocytes et tuer les cellules infectées afin de supprimer les réservoirs d'infection.

Les deux types d'immunité ne sont pas indépendants, mais au contraire participent de façon coordonnée aux mécanismes de défense. En 1999, Medzhitov et Janeway proposaient une théorie intégrative suggérant une liaison étroite entre les deux types de réponses, les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la reconnaissance des micro-organismes contrôlant la nature de la réponse immunitaire adaptative (Medzhitov et Janeway, 1999).

1.2 Réponse immunitaire innée

1.2.1 Présentation

L'immunité innée est la première ligne de défense contre les infections. Ces mécanismes, qui existent même avant la rencontre avec les microbes, sont activés par les microbes rapidement avant le développement de la réponse immunitaire adaptative. Selon les études phylogénétiques, l'immunité innée est le plus ancien mécanisme de défense qui a évolué pour protéger les organismes multicellulaires, incluant les plantes et les insectes, contre les infections, tandis que l'immunité adaptative est apparue chez les chondrichthyens vertébrés (les poissons cartilagineux) en tant que mécanisme plus perfectionné de la défense de l'hôte (FIG. 1) (Danilova, 2006).

L'élimination ou l'inhibition d'un composant de l'immunité innée augmente très nettement la susceptibilité aux infections, malgré une immunité adaptative intacte et fonctionnelle. La maladie granulomateuse chronique (CGD) est un déficit immunitaire héréditaire rare dû à une altération du gène codant pour l'enzyme NADPH oxydase qui est nécessaire à la destruction des microbes par les neutrophiles et les macrophages. Cette maladie est caractérisée par des infections récurrentes (Maródi et Notarangelo, 2007).

La réponse immunitaire innée contre les microbes induit et influence le type de la réponse adaptative. Autrement dit, l'immunité innée fournit au système d'immunité adaptative une alerte qui signale la présence d'une infection. Les mécanismes effecteurs de l'immunité innée sont souvent utilisés pendant la réponse immunitaire adaptative. À titre d'exemple, les anticorps produits par les lymphocytes B (l'immunité humorale) éliminent les microbes en utilisant deux mécanismes effecteurs de l'immunité innée, les phagocytes et le système du complément.

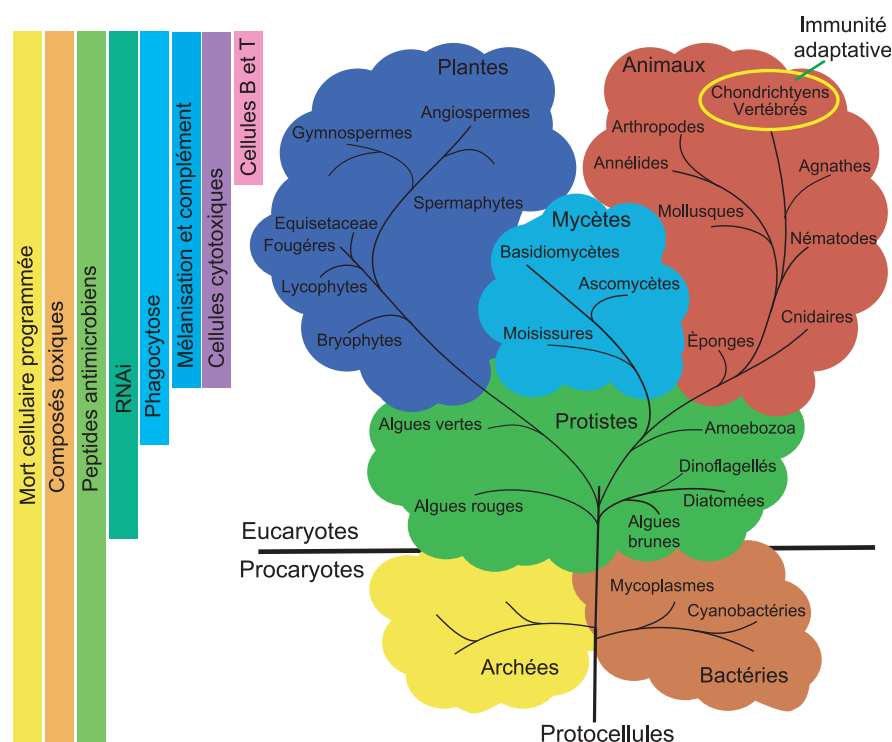


FIG. 1: Immunité innée et ses composants au cours de l'évolution (Danilova, 2006).

1.2.2 Composants de l'immunité innée

Le système immunitaire inné est composé d'*epithelia*, de cellules qui se trouvent dans la circulation, de tissus, et de plusieurs protéines plasmatiques. Ces composants jouent des rôles différents, mais complémentaires, en bloquant l'entrée des microbes et en éliminant les microbes qui pénètrent les tissus de l'hôte.

Éléments de reconnaissance des micro-organismes par l'immunité innée

Les composants de l'immunité innée reconnaissent des structures qui sont partagées par différentes classes de microbes, et qui ne sont pas présents sur les cellules de l'hôte. Par exemple, les phagocytes expriment des récepteurs pour le lipopolysaccharide bactérien (LPS, également appelé endotoxine), qui est présent chez de nombreuses espèces bactériennes (Janeway et Medzhitov, 2002). D'autres récepteurs des phagocytes reconnaissent les résidus mannose terminaux des glycoprotéines bactériennes ; de nombreuses glycoprotéines bactériennes présentent un mannose en position terminale, contrairement aux glycoprotéines des mammifères qui se terminent par un acide sialique ou par la N-acétylgalactosamine. Les molécules microbiennes qui constituent les cibles

de l'immunité innée (TAB. I) sont parfois désignées par le terme de motifs moléculaires associés aux pathogènes (*Pathogen Associated Molecular Pattern, PAMP*) ou motifs moléculaires associés aux microbes (*Microbe Associated Molecular Pattern, MAMP*) lorsqu'il s'agit de micro-organismes non pathogènes de la flore commensale (Zipfel, 2008).

TAB. I: Les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) et les récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (PRR) de l'immunité innée (Abbas et Lichtman, 2005).

Motif moléculaire associé aux pathogènes (PAMP)	Origine	Récepteur de reconnaissance des motifs moléculaires (PRR)	Réponse principale de l'immunité innée
ARN double brin	Les virus en répliation	Le récepteur Toll-like ?	La production de l'interféron de type I par les cellules infectées
LPS	Paroi des bactéries à Gram ⁻	Le récepteur Toll-like/CD14	L'activation du macrophage
Nucléotides CpG non méthylés	ADN bactérien	Le récepteur Toll-like	L'activation du macrophage
N-formylméthionyl peptides	Protéines bactériennes	Récepteurs aux N-formylméthionyl peptides	L'activation du macrophage et de neutrophiles
Les glycanes riches en mannose	Glycoprotéines et glycolipides bactériens	1. Le récepteur de mannose des macrophages (MMR) 2. La lectine liant le mannose (MBL)	1. Phagocytose 2. Opsonisation, l'activation du système du complément
Phosphorylcholine	Membrane microbienne	La protéine C réactive du plasma	Opsonisation, l'activation du système du complément

Ces différents types de motifs correspondent à des substances microbiennes, qui sont souvent essentielles à la survie et au pouvoir infectieux des micro-organismes. Par conséquent, un microbe ne peut pas échapper à l'immunité naturelle simplement en mutant ou en n'exprimant pas les cibles de la reconnaissance de l'immunité naturelle. Les récepteurs de l'immunité innée qui reconnaissent ces structures partagées sont appelés récepteurs de reconnaissance des motifs moléculaires (*Pattern Recognition Receptors, PRR*). Ils sont exprimés au niveau de la surface cellulaire, des compartiments intracellulaires ou bien sont sécrétés dans le sang et les fluides tissulaires (Janeway et Medzhitov, 2002).

En ce qui concerne les PRRs, trois familles ont été décrites : les PRRs solubles (opsonines) et deux types de récepteurs cellulaires, les récepteurs d'endocytose et les

récepteurs de signalisation (Delneste et al., 2007). Les opsonines se fixent aux micro-organismes et facilitent leur élimination par les cellules phagocytaires ; il s'agit notamment des facteurs du complément et des molécules de la famille des pentraxines : les molécules de la phase aiguë de l'inflammation telle que la CRP (protéine C réactive), la SAP (protéine amyloïde du sérum), et la molécule PTX 3.

Les récepteurs membranaires d'endocytose, sont impliqués dans la reconnaissance et l'internalisation des micro-organismes. Ces récepteurs, parmi lesquels figurent la famille des *scavenger receptors* et les lectines de type C, sont exprimés sélectivement par les cellules à forte activité d'endocytose, telles que les monocytes et les macrophages.

Les récepteurs de signalisation sont, quant à eux, impliqués dans l'activation des cellules ayant rencontré un micro-organisme. Ils appartiennent à la famille des molécules TLR (*Toll-Like Receptor*), à la famille des molécules NOD (*Nucleotide-binding Oligomerization Domain*) et à la famille des hélicases (Delneste et al., 2007).

Les micro-organismes pathogènes et symbiotiques expriment tous les deux les mêmes motifs moléculaires, mais les espèces inoffensives ne génèrent pas une réponse immunitaire, ce qui veut dire que la reconnaissance des MAMPs n'est pas suffisante et qu'un signal spécifique de danger est nécessaire. Les différentes molécules libérées par les cellules endommagées peuvent jouer ce rôle (Danilova, 2006). Les PRRs reconnaissent aussi les cellules apoptotiques et les cellules du soi endommagées, modifiées par l'infection.

L'épithélium : barrière intelligente

Les portes d'entrée les plus fréquentes des microbes, à savoir la peau, le tractus gastro-intestinal et le tractus respiratoire, sont bordées par des *epithelia* continus qui constituent des barrières physiques et chimiques contre les infections. Les cellules épithéliales sont la première ligne de défense contre les pathogènes inhalés. Ils expriment des PRRs tels que les TLRs et les PAR1-PAR4, qui reconnaissent respectivement les motifs microbiens et les allergènes (Kato et al., 2007). Cette reconnaissance exige la production et la libération de médiateurs tels que des facteurs de croissance et des cytokines impliqués dans l'attraction et l'activation des cellules inflammatoires (TAB. II) (Maury et al., 2003).

En particulier, l'interleukine 8 (CXCL-8) est libérée par la cellule épithéliale bronchique en réponse à des produits bactériens comme l'endotoxine, et permet l'attraction des neutrophiles, de plus, elle est accessoirement un activateur de certains lymphocytes et des éosinophiles activés (Baggiolini, 1998). Les cellules épithéliales produisent également des peptides antimicrobiens (PAMs). La défense naturelle de la peau semble donc être, chez l'homme sain, en partie assurée par les PAMs exprimés dans l'épiderme, soit de façon constitutive dans les zones les plus superficielles, et stockés dans la couche cornée (lysozyme et RNase 7), soit de façon inductible, dans la partie

TAB. II: Les médiateurs libérés par la cellule épithéliale du système respiratoire (Maury et al., 2003).

- **Médiateurs dérivés de l'acide arachidonique** : PGE₂, PGI₂, PGF₂, LTB₄, LTC₄, PAF
- **Cytokines** : TNF- α , IFN- γ , IL1- β , IL-3, IL-6, IL-5, IL-10, TGF- β , IL-16
- **CXC chimiokines** : IL-8
- **CC chimiokines** : MDC, TARC, CCL5 (*RANTES*), MIP-1 α , MIP-1- β , MIP-2 (GRO)
- **Molécules antimicrobiennes** : Lysozyme, Lactoferrine, Défensines, Lectines du surfactant : SP-A, SP-D
- **Facteurs de croissance** : GM-CSF, G-CSF
- **Facteurs du complément** : C2, C3, C4, C5
- **Mucines**
- **Dérivés de l'oxygène (NO)**

plus profonde de l'épiderme (défensine- β et cathélicidine) (Schröder et Harder, 2006). Cette thématique sera plus développée dans le chapitre II. Récemment, la présence de catestatine, un PAM dérivé de la chromogranine A (CGA 352-372), a été montrée au niveau de l'épiderme (Radek et al., 2008). Ces auteurs ont aussi démontré que l'expression de CGA/catestatine par les kératinocytes est augmentée à la suite d'une infection ou d'une blessure.

La phagocytose et les phagocytes : neutrophiles et monocytes/macrophages

La phagocytose est le procédé, conservé au cours de l'évolution, par lequel les microbes, les corps apoptotiques ou nécrotiques sont détruits et digérés par les phagocytes (Greenberg et Grinstein, 2002). Elle a été découverte par Elie Metchnikoff, zoologiste et biologiste russe (1845—1916) qui reçut le prix Nobel de physiologie et de médecine pour cette découverte (FIG. 2).

Les deux types de phagocytes circulants, les neutrophiles et les monocytes, sont des cellules sanguines qui sont recrutées au niveau des sites d'infections où ils reconnaissent et ingèrent les microbes afin de les détruire à l'intérieur de la cellule. Les neutrophiles constituent le premier type cellulaire à répondre à la plupart des infections, en particulier les infections bactériennes et fongiques. Les cellules présentatrices des antigènes (CPAs), particulièrement les cellules dendritiques, utilisent la phagocytose afin d'adresser les antigènes aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et II (Larsson et al., 2001). Ainsi, la phagocytose est non seulement un effecteur

crucial de l'immunité innée, mais elle assure aussi un pont entre les réponses immunitaires innée et adaptative.

La rapidité de réponse des neutrophiles leur assure une aptitude à la migration au site d'infection bien supérieure à celle des autres types cellulaires. Cette étape de l'immunité innée fait appel à divers types de récepteurs présents à la surface des neutrophiles pour la capture des pathogènes (exemple : récepteurs pour certains fragments du complément, fragments Fc des immunoglobulines, mannose, β -glucan etc.). À cette liste non exhaustive doivent être ajoutés les TLRs qui représentent certainement une des voies de reconnaissance les plus importantes et les plus sophistiquées (Beutler, 2004).

Une fois le pathogène reconnu, celui-ci est progressivement ingéré en passant par diverses étapes intracellulaires de dégradation et de digestion. Certaines armes anti-infectieuses, initialement monocytaires, font également partie de l'arsenal granulaire du neutrophile. C'est le cas, par exemple, des défensines, de la perforine et des granzymes (Chertov et al., 2000; Wagner et al., 2004). Le neutrophile peut aussi assurer une défense innée en libérant des protéines granulaires et de la chromatine afin de former un réseau de fibres extracellulaires (*Neutrophil Extracellular Traps, NETs*) capables de fixer les bactéries et d'en diminuer la virulence (Brinkmann et al., 2004). Ainsi, les NETs assurent des concentrations locales relativement élevées de substances antimicrobiennes.

L'hétérogénéité des neutrophiles permet aussi de comprendre les différences entre individus quant à leur capacité de défense contre les micro-organismes. En effet, à côté de neutrophiles dits normaux n'exprimant pas spontanément cytokines et chimiokines (cytokines chimotactiques), des sous populations de neutrophiles expriment de façon variable des cytokines comme l'IL-12 ou l'IL-10, des chimiokines comme CCL3 ou CCL2, des TLR comme TLR5-TLR8 ou TLR7-TLR9. Cette découverte s'est faite à partir d'hôtes présentant soit une résistance, soit une sensibilité aux *Staphylococci aurei* résistants à la méthicilline (Tsuda et al., 2004). Contrairement aux neutrophiles, les monocytes qui pénètrent dans les tissus extravasculaires survivent dans ces sites pendant des périodes prolongées où ils se différencient en cellules appelées macrophages (du grec : gros mangeur). Outre la capacité d'éliminer les microbes phagocytés, les macro-



FIG. 2: La **phagocytose**. La capture des érythrocytes de l'oie par les macrophages du cobaye (Metchnikoff, 1905).

phages assurent plusieurs fonctions qui jouent des rôles importants dans les défenses contre les infections. Ils produisent des cytokines qui sont d'importants médiateurs des défenses de l'hôte (TAB. III). La majorité des macrophages (en situation non inflammatoire) résident à des endroits stratégiques. Ils sont ainsi présents aux endroits les plus susceptibles d'invasion microbienne ou d'accumulation de débris de toutes sortes.

Les cellules naturelles tueuses

Les cellules naturelles tueuses ou cellules NK (pour *Natural Killer*) sont des lymphocytes issus d'un précurseur commun aux lymphocytes T. Elles représentent une des composantes cellulaires du système immunitaire impliquées principalement dans la réponse immunitaire innée. Leur appellation de tueuses vient de leur capacité, connue de longue date, à détruire une cible cellulaire par cytotoxicité directe sans immunisation préalable, contrairement à la cytotoxicité des lymphocytes T (Kiessling et al., 1975). Les cellules NK reconnaissent les cellules de l'hôte qui ont été altérées par une infection microbienne.

Contrairement aux lymphocytes T et B, les cellules NK n'expriment pas de récepteurs spécifiques pour l'antigène (TCR et BCR). La reconnaissance des cellules cibles et l'activation des fonctions cytotoxiques sont donc dévolues à d'autres structures. La cytotoxicité est soit directe sans immunisation préalable, soit dépendante d'anticorps (ADCC) *via* le CD16 qui permet indirectement (par l'intermédiaire des IgGs) l'acquisition d'un répertoire antigénique (Vivier et al., 2008). Les effecteurs de la cytotoxicité sont la perforine et le granzyme, libérés par l'exocytose des granules cytoplasmiques au contact de la cible. Après activation, les cellules NK produisent différentes cytokines (IFN- γ , TNF α , IL-1 β , IL-10, IL-3, IL-5, et IL-13) et chimiokines (IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β et CCL5, ou *RANTES*) (Cooper et al., 2001). Celles-ci sont impliquées dans les défenses anti-infectieuses, comme l'IFN- γ , un activateur puissant des fonctions microbicides des phagocytes, particulièrement les macrophages, produit précocement au cours d'une infection (Biron et al., 1999). Ces macrophages ingèrent les microbes et produisent l'IL-12 activatrice des cellules NK qui sécrètent de l'IFN- γ . Celui-ci active à son tour les macrophages afin qu'ils détruisent les microbes ingérés. Par la production de cytokines et de chimiokines les cellules NK participent aussi à l'orientation de la réponse immunitaire, Th1 ou Th2, et permettent le recrutement d'autres composants cellulaires de la réponse immunitaire.

L'autophagie

L'autophagie (Cuervo, 2004) est un terme global qui regroupe les trois voies de dégradation lysosomale des constituants cellulaires tels que la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie dépendante de protéines chaperonnes (FIG. 3).

La macroautophagie est le mécanisme permettant à la cellule de digérer une partie de son contenu, que ce soit du cytoplasme, des protéines ou des organites cellulaires.

Il s'agit de la formation d'un autophagosome dans le cytoplasme, vacuole délimitée par une double membrane, qui séquestre, en général de façon non sélective, des macromolécules et des organites. L'autophagosome fusionne avec les lysosomes pour former des autolysosomes, ce qui mène à la dégradation des constituants cytosoliques capturés. L'autophagie joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et dans l'adaptation et la survie des cellules soumises à des conditions de stress, notamment dans le cas du stress métabolique. Outre ces fonctions, l'autophagie est également impliquée dans la modulation de l'immunité innée déclenchée par des agents pathogènes et de l'immunité adaptative médiée par la présentation d'antigènes par le système majeur d'histocompatibilité de classe II. Le terme immunophagie a été proposé pour définir ces fonctions

(Deretic, 2006). La macroautophagie n'élimine pas seulement les pathogènes dans le cytosol, mais aussi peut viser certains phagosomes conditionnés (en tant que niche de réplication) par les bactéries ou les parasites. Récemment, un mécanisme de protection dépendant de l'autophagie a été démontré (Alonso et al., 2007) : l'activité protéolytique présente dans les lysosomes génère un peptide antimicrobien dérivé de l'ubiquitine (ubifungine) à partir des protéines ubiquitinées présentes dans la phagosome, suite à la fusion avec le lysosome (Kieffer et al., 2003; Alonso et al., 2007). La modulation de l'autophagie est récemment apparue comme un enjeu thérapeutique dans certaines

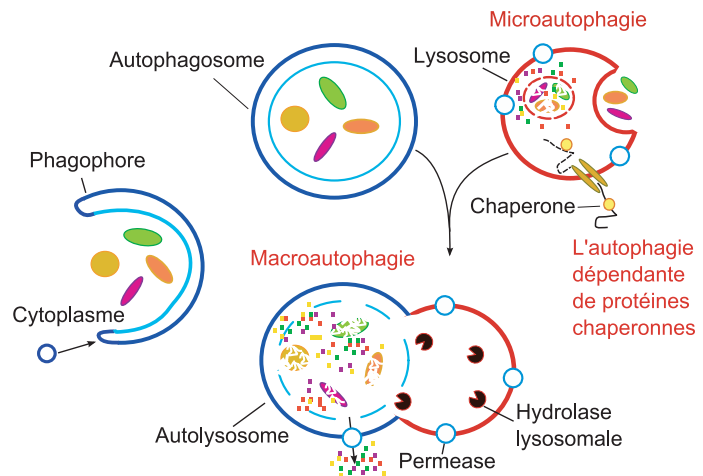


FIG. 3: Les différents types d'autophagie. Les différents types d'autophagie (Mizushima et al., 2008). La microautophagie consiste en la dégradation du contenu cytoplasmique des cellules par les lysosomes. Dans la macroautophagie, une vésicule multi-membranaire, appelée phagophore, s'allonge pour séquestrer du matériel cytoplasmique, formant ainsi une vacuole d'autophagie ou autophagosome. Cette vacuole fusionne avec un endosome ou un lysosome et son contenu est ensuite dégradé par des protéases. Les macromolécules résultantes sont libérées dans le cytosol par des perméases membranaires. L'autophagie médiée par des chaperonnes consiste en une translocation directe des protéines non structurées à travers la membrane des lysosomes par intermédiaire d'un chaperone cytosolique et lysosomal (hsc70) et le récepteur membranaire LAMP-2A (*Lysosome-Associated Membrane Protein type 2A*).

pathologies comme les maladies neurodégénératives et le cancer (Rubinsztein et al., 2007).

Le système du complément

Le système du complément a été décrit pour la première fois en 1890 comme une protéine thermolabile du sérum qui complétait les anticorps thermostables afin de tuer les bactéries. Il s'agit d'un système biologique qui regroupe plus de 20 protéines plasmatiques et membranaires jouant un rôle important dans la défense de l'hôte contre les agents infectieux tel que la capacité à déclencher la réaction inflammatoire, à opsoniser et à induire la lyse de micro-organismes (Morgan et al., 2005). Les différentes protéines du complément sont des proenzymes inactives qui sont activées en cascade par clivage protéolytique. La cascade du complément peut être activée par trois voies : la voie alterne, la voie classique et la voie des lectines. La voie alterne est la première défense apparue au cours de l'évolution. Elle est la première entrant en jeu lors d'une infection de l'organisme par un germe inconnu, avant une réponse immunitaire spécifique. Elle est déclenchée lorsque certaines protéines du complément sont activées à la surface des microbes et est une composante de l'immunité innée. La voie classique est déclenchée après liaison des anticorps aux microbes ou à d'autres antigènes, ce qui en fait une composante de l'immunité adaptative à médiation humorale. La voie des lectines est activée lorsqu'une protéine plasmatique, la lectine liant le mannose, se lie aux résidus mannose terminaux des glycoprotéines de surface des microbes. Cette lectine active les protéines de la voie classique, mais dans la mesure où l'activation est initiée en l'absence d'anticorps, ce processus est un élément de l'immunité innée.

La protéine C3 est le composant central du complément. Suite à l'activation du complément, la protéine C3 est clivée par des enzymes produites au cours des étapes initiales afin de générer la C3b. C3b se fixe aux microbes et favorise la liaison de ces microbes aux phagocytes, grâce aux récepteurs de C3b exprimés sur les phagocytes (Morgan, 2000). Les éléments chimiotactiques générés par la dégradation des protéines du complément (telles que le C5a et le C3a), favorisent l'inflammation au site d'activation du complément en attirant les neutrophiles et les monocytes. Ainsi, l'activation du complément culmine avec la formation d'un complexe de protéines polymérisées qui s'insère dans la membrane cellulaire microbienne, formant des pores responsables d'un influx d'eau et d'ions provoquant la mort du pathogène. L'activation du complément génère aussi des peptides antimicrobiens (Nordahl et al., 2004). Le C3a, un facteur chimiotactique et anaphylactique dérivé du C3, exerce une activité antimicrobienne importante bien conservée au cours de l'évolution des invertébrés à l'homme (Pasupuleti et al., 2007).

Les cytokines de l'immunité innée

Le terme *cytokine* fut introduit en 1974 par Stanley Cohen pour définir un groupe hétérogène des petites protéines solubles (de 8 à 45 kDa) qui servent de médiateurs dans les réactions immunitaires et inflammatoires, et sont responsables des communications entre leucocytes, ainsi qu'entre leucocytes et autres cellules (Cohen et al., 1974). Dans l'immunité innée, les principales sources de cytokines sont les macrophages activés par la reconnaissance de microbes (TAB. III). Dans les réactions de l'immunité innée contre les infections, suffisamment de macrophages peuvent être activés pour que de grandes quantités de cytokines soient produites, et qu'elles puissent agir à distance de leur site de sécrétion. Les cytokines de l'immunité innée assurent des fonctions variées dans les défenses de l'hôte. À titre d'exemple, le TNF, l'IL-1 et les chimiokines sont les principales cytokines participant au recrutement des neutrophiles et des monocytes sanguins vers les sites d'infection (Tosi, 2005).

Dans les infections virales, les macrophages et les autres cellules infectées produisent des interférons de type I, qui inhibent la réplication virale et empêchent la propagation de l'infection aux cellules non infectées.

Les chimiokines

L'efficacité du système immunitaire dépend de la mobilité des différents types cellulaires qui le composent et ne cessent de circuler entre le sang, les tissus périphériques et les organes lymphoïdes. Dans ce contexte, les chimiokines jouent un rôle assez important. Les cytokines chimio-attractantes, ou chimiokines, sont une famille de petites protéines solubles (de 8 à 14 kDa), avec des séquences similaires et une structure commune maintenue par un ou deux pont(s) disulfure(s) conservé(s) (Esche et al., 2005). Le nombre et l'espacement des deux premiers résidus cystéine permettent de distinguer quatre sous-familles, dénommées XC, CC, CXC et CX3C (FIG. 4). Toutes les chimiokines exercent leurs fonctions en se fixant sur des récepteurs couplés aux protéines G. La fonction première des chimiokines, le chimiotactisme, prend place dans le processus plus large du recrutement des leucocytes depuis le flux circulant jusqu'à leur

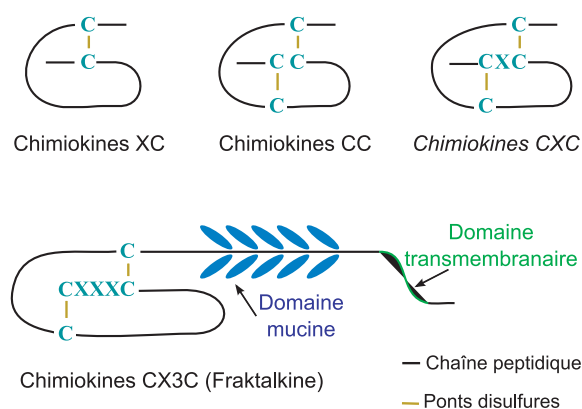


FIG. 4: Les 4 sous-familles de chimiokines.

TAB. III: Certaines caractéristiques des cytokines principales de l'immunité innée (Abbas et Lichtman, 2005).

Cytokine	Source cellulaire principale	Cibles cellulaires principales et effets biologiques
Facteur de nécrose des tumeurs (TNF)	Macrophages Lymphocytes T	Cellules endothéliales : activation (inflammation, coagulation) Neutrophiles : activation Hypothalamus : fièvre Foie : synthèse de protéines de la phase aiguë Muscles et tissu adipeux : catabolisme (cachexie) Nombreux types cellulaires : apoptose
Interleukine-1 (IL-1)	Macrophages Cellules endothéliales Certaines cellules épithéliales	Cellules endothéliales : activation (inflammation, coagulation) Hypothalamus : fièvre Foie : synthèse de protéines de la phase aiguë
Chimiokines	Macrophages Cellules endothéliales Lymphocytes T Fibroblastes, plaquettes	Leucocytes : chimiotactisme, activation
Interleukine-12 (IL-12)	Macrophages Cellules dendritiques	Cellule NK et lymphocytes T : synthèse d'IFN- γ , augmentation de l'activité cytolytique Lymphocytes T : différenciation en lymphocytes TH1
Interféron- γ (IFN- γ)	Cellules NK Lymphocytes T	Activation des macrophages Stimulation de certaines réponses par anticorps
Interféron de type I (IFN- α , IFN- β)	IFN- α : macrophages IFN- β : fibroblastes	Toutes les cellules : action antivirale, augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe I Cellules NK : activation
Interleukine-10 (IL-10)	Macrophages Lymphocytes T (en particulier TH2)	Macrophages : inhibition de la production d'IL-12 Réduction de l'expression des molécules de costimulation et des molécules du CMH de classe II
Interleukine-6 (IL-6)	Macrophages Cellules endothéliales Lymphocytes T	Foie : synthèse de protéines de la phase aiguë Lymphocytes B : prolifération des cellules productrices d'anticorps
Interleukine-15 (IL-15)	Macrophages Autres cellules	Cellules NK : prolifération Lymphocytes T : prolifération
Interleukine-18 (IL-18)	Macrophages	Cellules NK et lymphocytes T : synthèse d'IFN- γ

site d'action, notamment inflammatoire. Les chimiokines possèdent aussi une activité antimicrobienne; dans une étude sur 30 chimiokines humaines, deux tiers ont montré avoir une telle activité (Yang et al., 2003). La chimiokine CXCL7, isolée des granules- α de plaquettes, est active contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Yang et al., 2004). Les chimiokines CCR3 et CCL28, qui sont présentes en

1.3. INTERFACE ENTRE L'IMMUNITÉ INNÉE ET L'IMMUNITÉ ADAPTATIVE ET LEUR RELATION LORS D'UNE INFECTION

fortes concentrations dans le lait et la salive, sont actives contre *Candida albicans* et contre les bactéries à Gram positif ou Gram négatif (Hieshima et al., 2003).

1.3 Interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative et leur relation lors d'une infection

Pendant de nombreuses années, les immunologistes ont dissocié les deux types de réponses immunitaires, innée et adaptative. En 1999, Charles Janeway a proposé une théorie intégrative suggérant une liaison étroite entre les deux types de réponse, les mécanismes moléculaires mis en jeu lors de la reconnaissance des micro-organismes contrôlant la nature de la réponse immunitaire adaptative (Medzhitov et Janeway, 1999). La dépendance de la réponse immunitaire adaptative vis-à-vis des éléments de l'immunité innée est connue depuis 1960, quand il a été démontré que pour une réponse lymphocytaire effective contre les antigènes, la présence des phagocytes mononucléaires en tant que cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) est essentielle (Dutton, 1967). Parmi les cellules CPAs, les cellules dendritiques sont des acteurs de l'immunité innée qui jouent un rôle important dans l'interface entre immunité innée et adaptative. Elles sont les seules cellules capables d'activer les lymphocytes T naïfs et d'adresser les peptides antigéniques aux CMH de classe I et II (Rescigno et al., 1998; Guermonprez et al., 2003). Suite à la détection de signaux de danger dans les tissus, tels que les PAMPs, les cellules dendritiques subissent une maturation. Cette maturation se traduit par une augmentation de la synthèse, ainsi qu'une expression stable des molécules du CMH (Chain, 2003). Le premier signal présenté par les cellules dendritiques constitue l'interaction entre le récepteur de lymphocyte T (TCR) et l'ensemble constitué de l'antigène lié au CMH de la cellule dendritique. Le deuxième signal correspond à une molécule de costimulation ou de coinhibition, exprimée sur les cellules dendritiques. En l'absence de ce deuxième signal ou dans le cas d'une molécule de coinhibition, le lymphocyte T n'arrive pas à répondre face à l'antigène et peut alors devenir tolérant à celui-ci. Le troisième signal stimule la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ en cellules Th1, Th2 ou Treg (Lymphocyte T régulateur). En effet, ce signal détermine la polarisation fonctionnelle des lymphocytes T, ce qui indique le rôle actif de l'immunité innée dans la réponse adaptative.

Comment les cellules dendritiques distinguent-elles les différents PAMPs afin de réaliser cette polarisation fonctionnelle des lymphocytes ? Les agents responsables sont les PRRs : grâce à eux les cellules de l'immunité innée sont capables de signaler d'une manière spécifique la présence de chaque PAMP. L'interaction entre les différents PRRs augmente la sensibilité, la spécificité et la diversité des signaux. Parmi les différents types de PRR, les TLRs jouent un rôle prépondérant dans l'activation des cellules de l'immunité innée et constituent des interfaces moléculaires entre immunité innée et

immunité adaptative (TAB. IV). Ils sont exprimées sur les surface (TLR1, 2, 4, 5, 6

TAB. IV: Agonistes des molécules TLR humaines (Delneste et al., 2007).

Famille	Agonistes microbiens	Agonistes du soi	Autres
TLR-1 (+TLR-2)	Triacyl lipopeptides (bactéries, mycobactéries)		
TLR-2	Lipoprotéines/lipopeptides (nombreux pathogènes) Peptidoglycane et acide lipotéichoïque (bactéries Gram+) Lipoarabinomannane (mycobactérie) OmpA (bactérie à Gram -)	HSP70	
TLR-3	ARN double brin (virus)		
TLR-4	Lipopolysaccharide (bactérie à Gram-) Protéines virales (RSV, MMTV)	HSP2 Domaines de fibronectine, acide hyaluronique et héparane sulfate	
TLR-5	Flagelline (bactérie)		
TLR-6 (+TLR-2)	Diacyl lipopeptides (mycoplasme)		
TLR-7	ARN simple brin (virus)		imidazoquinoline loxoribine bropirimine
TLR-8	ARN simple brin (virus)		Imidazoquinoline
TLR-9	ADN hypométhylé (bactérie) Hémozoïne Séquences CpG	Complexes autoanticorps/ ADN génomique	
TLR-10	?		

et 11) ou les membranes endosomales intracellulaires (TLR3, 7, 8, et 9) (Kabelitz et Medzhitov, 2007). De manière générale, une activation *via* les TLRs augmente les activités cytotoxiques des cellules immunitaires. L'activation des cellules NK induit la production de peptides antimicrobiens (défensines), de cytokines immunostimulatrices (IFN- γ , IL-6, IL-8) et potentialise leurs activités cytotoxiques (Sivori et al., 2004). L'activité phagocytaire des macrophages est également augmentée en réponse aux ligands des TLRs. Ainsi, les neutrophiles sont activés (libération du contenu des granules) en réponse aux agonistes des TLRs. Les TLRs sont également exprimés par les cellules de l'immunité adaptative (lymphocytes B et lymphocytes T). Les lymphocytes B expriment la molécule RP105 (homologue à TLR4) qui, en s'associant à la molécule adaptatrice MD1, leur permet d'être activés par le LPS (Nagai et al., 2002). Les cellules B sont également activées par les séquences CpG, agonistes de la molécule TLR9 (Pasare et Medzhitov, 2005). L'activation des cellules B par les agonistes des molécules TLRs est importante pour la mise en place et le maintien de la réponse d'un anticorps

1.3. INTERFACE ENTRE L'IMMUNITÉ INNÉE ET L'IMMUNITÉ ADAPTATIVE ET LEUR RELATION LORS D'UNE INFECTION

spécifique d'un antigène. Ainsi, les lymphocytes T mémoires, présents dans les tissus périphériques, peuvent être activés par des ligands des TLRs et sont donc capables de déclencher rapidement une réponse immune protectrice (Caron et al., 2005). Les ARNs codant pour les molécules TLRs sont exprimés par les cellules épithéliales. Leur activation induit la production de cytokines immunostimulatrices (IFN- γ , IL-6, IL-8), ainsi que l'expression de molécules d'adhérence impliquées dans le recrutement, l'activation et la migration des cellules immunitaires au site de l'infection (Abreu et al., 2001). Les agonistes des molécules TLRs induisent également l'activation des fibroblastes (ce qui induit la production de cytokines, de chimiokines et de peptides antimicrobiens) et des cellules endothéliales (production de cytokines et de chimiokines). L'ensemble de ces données montre que la majorité des cellules exprimant les molécules TLR peuvent être activées, directement ou en présence de molécules costimulatrices (lymphocytes B et T, cellules NK), par des agonistes des molécules TLR. Les CPA et en particulier les cellules dendritiques, sont les principales cibles des agonistes TLR. Les cellules dendritiques sont les émissaires primordiaux de l'interaction entre immunité innée et adaptative ; néanmoins, dans certains cas d'autres éléments de l'immunité innée répondent directement aux lymphocytes T. À titre d'exemple, certains peptides antimicrobiens comme la défensine hBD-2 sont chimiotactiques pour les lymphocytes T (Yang et al., 1999).

Le dialogue entre les deux systèmes immunitaires n'est pas unilatéral. Les anticorps sécrétés par les lymphocytes B peuvent se fixer sur les phagocytes comme les macrophages par le récepteur Fc, ce qui permet aux macrophages de reconnaître, d'internaliser et d'éliminer efficacement les pathogènes (Clark et Kupper, 2005).

En conclusion, la grande interdépendance entre l'immunité innée et l'immunité adaptative est essentielle pour obtenir une réponse immunitaire efficace au cours d'une infection.

Plusieurs études ont démontré que le système immunitaire et le système nerveux communiquent par une régulation réciproque chez l'hôte (Butts et Sternberg, 2008). En effet, les protéines sécrétées au cours d'une réponse immunitaire peuvent stimuler les cellules du système nerveux et faire apparaître les symptômes liés à la maladie. D'autre part, les facteurs sécrétés par le système neuroendocrine peuvent changer l'activité des cellules immunitaires. De plus, plusieurs neuropeptides possèdent une activité antimicrobienne et peuvent être impliqués dans la réponse immunitaire innée (Brogden et al., 2005). Cette interaction sera discutée dans la partie suivante.

1.4 Relations entre le système immunitaire inné et le système nerveux

Le système nerveux central (SNC) est capable de réguler l'immunité innée par des voies endocrines et neuronales. Le système nerveux sympathique, ou adrénargique (SNS) et le système nerveux parasympathique, ou cholinergique (SNP) 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 (Sternberg, 2006).

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. L'effet de facteurs neuroendocrines sur le système immunitaire a été démontré pour la première fois par les pathologistes qui découvrirent l'influence de l'altération hormonale sur la taille du thymus (Selye, 1941). Ils avaient observé un rétrécissement au niveau du thymus et des organes lymphoïdes suite à l'activation de l'axe hypothalamo–hypophyso–surrénalien (HHS) par un stress physique ou psychologique. En effet, les systèmes neuroendocrine et immunitaire sont reliés entre eux par un réseau d'interactions bidirectionnelles qui, d'une part, permettent aux hormones de moduler les fonctions immunologiques et d'autre part, permettent aux réponses immunitaires d'influencer les réponses neuroendocriniennes.

Les résultats cités dans la littérature ont montré que les cellules immunitaires contiennent la machinerie moléculaire nécessaire pour répondre aux facteurs neuro-naux, y compris les récepteurs des neurotransmetteurs, des neuropeptides et des neuro-hormones, ainsi que les composants de leurs voies de signalisation (Kawashima et Fujii, 2004). 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. 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 al., 2002; Maestroni et Mazzola, 2003).

1.4.1 Contrôle du SNS sur l'immunité

Les études *in vivo* dans lesquelles le SNS est supprimé, par sympathectomie chimique ou chirurgicalement par coupure de l'innervation sympathique des organes lymphoïdes, indiquent que le SNS joue 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 proinflammatoires (Madden et al., 1995; Johnson et al., 2005), la plupart des études indiquent que les effets du SNS sont inhibiteurs

(Maestroni et Mazzola, 2003).

L'activation du SNS qui se produit suite un stress, est associée à la diminution de l'activité des cellules NK (Benschop et al., 1994). Un prétraitement par les 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 une sympathectomie chimique), est immunosuppressive (Chelmicka-Schorr et al., 1988; Madden et al., 1989). *In vitro*, la noradrénaline module ses effets immunosuppresseurs sur les CD4 et les monocytes en empêchant la production des cytokines proinflammatoires, y compris le TNF, IL-1, IL-6 et IL-12, tout en augmentant la production des cytokines anti-inflammatoires, telles que IL-10, par ces cellules (van der Poll et al., 1994; Maestroni et Mazzola, 2003). 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 al., 2000; Lang et al., 2003; Maestroni et Mazzola, 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 Mazzola, 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 pourraient également contribuer à l'élimination des pathogènes et à la modulation de la réponse adaptative (Maestroni et Mazzola, 2003).

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 des cytokines proinflammatoires par les cellules NK et les macrophages 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 de l'immunité innée et de l'inflammation locale, afin de favoriser la guérison de la blessure.

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, les hormones produites dans les glandes surrénales. Plusieurs études ont confirmé que les hormones stéroïdes telles que les glucocorticoïdes et les hormones sexuelles (testostérone, œstrogène et progestérone), sont capables de modifier (*in vitro* et *in vivo*) les réponses immunitaires innées (Sternberg, 2006). L'effet immunosuppresseur d'un taux élevé d'hormones stéroïdes est montré dans certaines maladies. Pendant la grossesse, sous l'effet des

hormones sexuelles, la susceptibilité contre les infections (telles que *Listeria monocytogenes*) augmente (Bakardjiev et al., 2006). En effet, les concentrations élevées d'œstrogène et de progestérone induisent la suppression de la réponse des lymphocytes TH1 et la prédisposition aux infections, tandis que les concentrations physiologiques stimulent les réponses immunitaires (Erlebacher et al., 2004). Plusieurs études ont montré l'effet immunomodulateur des hormones sexuelles sur les neutrophiles. À titre d'exemple, l'œstrogène à forte concentration empêche la production de radicaux libres par les neutrophiles (Buyon et al., 1984) ainsi que leur adhésion aux cellules endothéliales (Geraldès et al., 2006). Ces mécanismes expliquent le rôle protecteur de l'œstrogène dans l'athérosclérose.

En général, les glucocorticoïdes répriment maturation, différenciation et prolifération des cellules immunitaires telles que les DCs et les macrophages (FIG. 5). Aux concentrations physiologiques, ils diminuent la production des cytokines proin-

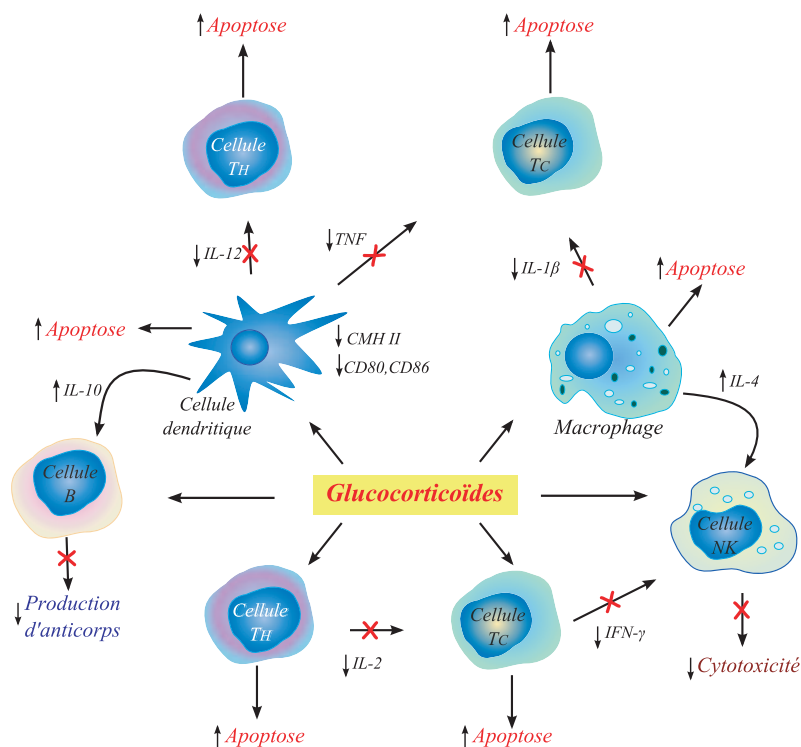


FIG. 5: Effets des glucocorticoïdes sur les cellules immunitaires. Les glucocorticoïdes peuvent agir sur les cellules immunitaires à la fois directement et indirectement pour supprimer la réponse inflammatoire (Sternberg, 2006).

flammatoires (IL-1, IL-6 et TNF) (Scheinman et al., 1995). Concernant le trafic cellulaire, les glucocorticoïdes inhibent l'expression de plusieurs molécules d'adhésion y compris ICAM-1, ELAM-1 et VCAM1 (Atsuta et al., 1999; Cronstein et al., 1992).

Ils inhibent également la production et la sécrétion des chimiokines telles que CCL2 et CXCL8 (connue également sous le nom d'IL-8) par les éosinophiles (Miyamasu et al., 1998). L'ensemble de ces effets sur différents éléments de l'immunité innée induit une diminution de la réponse inflammatoire.

Rôle de la médullo-surrénale sur l'immunité

Puisque la noradrénaline et le neuropeptide Y (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 circulants, 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 al., 1997; Oberbeck et al., 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'IL1 β (Papanicolaou et al., 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 al., 2003b), couplée à la présence des TLRs sur les cellules du cortex surrénalien, augmente la probabilité que les glandes surrénales aient un rôle plus direct dans l'activation des réactions immunitaires innées et l'élimination des agents infectieux.

Les peptides antimicrobiens

2 Les peptides antimicrobiens (PAMs)

2.1 Introduction

Avant le développement du système immunitaire adaptatif, le système immunitaire inné a évolué pendant deux millions d'années et constitue la défense primaire chez la plupart des organismes. Les peptides antimicrobiens (PAMs) sont des composants fondamentaux de la défense immunitaire innée des organismes multicellulaires animaux et végétaux (Radek et Gallo, 2007). Ils ont été très bien conservés au cours de l'évolution (FIG. 1) et assurent la défense des organismes contre la majorité des pathogènes.

L'histoire de la découverte des PAMs s'est déroulée en parallèle avec celle de la pénicilline. L'antagonisme constaté entre les bactéries et les champignons a mobilisé de nombreux chercheurs et a conduit à la découverte par Fleming, de la pénicilline (Fleming, 1929). Il découvre, par hasard, des zones d'inhibition dans des cultures de staphylocoques dorés au contact de champignons. Pendant la deuxième guerre mondiale, les travaux s'accélérent et s'orientent par nécessité vers la recherche du traitement des blessés. Depuis la fin de la guerre, la recherche et la production d'antibiotiques ont été très importantes. L'attention des chercheurs s'est focalisée essentiellement sur les champignons. Pendant ce temps, les venins des insectes, des serpents et les sécrétions des amphibiens intéressaient les chercheurs surtout pour leurs effets toxiques jusqu'aux travaux plus généraux et systématiques de Vittorio Erspamer, un neurobiologiste italien, en 1971. Il a montré que la peau des amphibiens est très riche en peptides présentant des activités biologiques diverses (hormones, facteurs de croissance, neuropeptides etc.). Constatant la multitude et la diversité de fonction de ces peptides, Erspamer prédit que tout peptide trouvé dans la peau de la grenouille trouvera son équivalent chez les mammifères (Erspamer, 1971).

En 1980, les Cécropines, peptides antibactériens, mais non hémolytiques, sont découvertes dans l'hémolymphe de la pupe d'un lépidoptère, *Hyalophora cecropia* (Steiner et al., 1981). Trois ans plus tard, les deux premières défensines (ce nom sera donné plus tard) sont isolées des macrophages du poumon du lapin (Lehrer et al., 1983). La découverte des magainines dans la peau d'un amphibien, *Xenopus laevis*, a fait prendre conscience à la communauté scientifique que les antibiotiques d'origine animale pourraient constituer la source de nouveaux antibiotiques utilisables en médecine

thérapeutique (Zaslouff, 1987).

La recherche de peptides antimicrobiens dans une grande variété du monde animal amène à la découverte des bacténécines dans les neutrophiles bovins, des défensines dans beaucoup d'espèces et de nombreux autres peptides (Lehrer, 2004; Romeo et al., 1988). La plupart sont de petites molécules (moins de 40 résidus), mais on identifie des protéines de haut poids moléculaire, comme les serprocidines, une famille de PAMs présente dans les granules azurophiles des neutrophiles humains et constituée de l'élastase, de la cathepsine G, de la protéinase 3 et de l'azurocidine (Gabay et Almeida, 1993; Almeida et al., 1996).

En considérant la diversité du monde vivant, on peut raisonnablement envisager que la nature a su développer un nombre considérable de peptides antibiotiques spécifiques, capables de protéger chaque organisme dans des milieux et des conditions de vie très différentes.

2.2 Classification des PAMs

En 2008, plus de 880 PAMs ont été identifiés y compris les PAMs produits dans plusieurs tissus et types cellulaires chez les invertébrés, plantes et animaux. Parmi ces peptides on retrouve des cytokines et chimiokines, certains neuropeptides et fragments dérivés de protéines qui possèdent une activité antimicrobienne (Brogden et al., 2005). L'ensemble des PAMs peut être divisé en sous-groupes (classes) en fonction de la composition en acides aminés et de la structure des peptides (TAB. V).

Le premier sous-groupe représente les PAMs anioniques tels que les petits peptides (722–824 Da) présents dans les extraits de surfactant, le fluide du lavage broncho-alvéolaire et les cellules épithéliales du système respiratoire humain, ovin et bovin (Fales-Williams et al., 2002; Brogden, 2005). Ces peptides sont produits à une concentration de l'ordre du millimolaire et ont besoin de zinc en tant que cofacteur pour leur activité antimicrobienne.

Le deuxième sous-groupe est constitué d'environ 300 peptides très fortement cationiques, formant des hélices α (<40 résidus) qui ne contiennent pas de résidu cystéine, et pouvant avoir une charnière (*hinge*) dans leur partie centrale (Yount et al., 2006). Le meilleur exemple de ce sous-groupe est LL-37, un peptide dérivé de la cathélicidine humaine. Les cathélicidines contiennent un domaine cathéline (inhibiteur de la cathepsine L) de 100 acides aminés à leur extrémité N-terminale, conservé au cours de l'évolution et, à leur extrémité C-terminale, un domaine variable hautement cationique, α -hélicoïdal, portant une activité antimicrobienne (FIG. 6b) (Dürr et al., 2006).

Le troisième sous-groupe est constitué de 44 peptides cationiques qui sont riches en certains acides aminés tels que les bacténécines et PR-39 riches en proline (33–49 %) et arginine (13–33 %), et l'indolicidine riche en tryptophane (39 %) (Niidome et al., 1998;

TAB. V: Les différentes classes de peptides antimicrobiens (Brogden et al., 2005).

<p>Peptides anioniques</p> <ul style="list-style-type: none"> • Maximine H (amphibiens) • Petites peptides anioniques riches en Glu et Asp (mouton, bœuf et homme) • Dermcidine (homme)
<p>Peptides cationiques linéaires à hélice α</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cécropines A, andropine, moricine, cératoxine et melittine (insectes) • Cécropine P1 (nématode) • Magainine, dermaseptine, bombinine, brévinine-1, esculantines et buforine II (amphibiens) • Pleurocidine (sécrétions mucoales de la peau de plie rouge) • Séminaplasmine, BMAP, SMAP (SMAP29, ovispirine), PMAP (mouton, bœuf et porc) • CAP18 (lapin) • LL-37 (homme)
<p>Peptides cationiques riches en certains acides aminés</p> <ul style="list-style-type: none"> • Peptides riches en proline : abaécine (abeille à miel) • Peptides riches en proline et arginine : apidaécines (abeilles à miel), drosocine (drosophile), pyrrocoricine (gendarme ou diable cherche-midi, <i>Pyrrhocoris apterus</i>), bacténécines (bœuf) Bac7, mouton et chèvre), PR-39 (porc) • Peptides riches en proline et phénylalanine : prophénine (porc) • Peptides riches en glycine : hyménotaécine (abeille à miel) • Peptides riches en proline et glycine : coléoptéricine et holotricine (coléoptères) • Peptides riches en tryptophane : indolicidine (bœuf) • Petits polypeptides salivaires riches en histidine : histatines (homme et certains primates)
<p>Peptides cationiques et anioniques qui contiennent des cystéines et des ponts disulfures</p> <ul style="list-style-type: none"> • Peptides qui contiennent un pont disulfure : brévinine (<i>Rana dybowskii</i>, grenouille) • Peptides qui contiennent deux ponts disulfures : protégrine (porc), tachyplésines (limule) • Peptides qui contiennent trois ponts disulfures : défensines α (homme : HNP-1, HNP-2, cryptidine ; lapin : NP-1 ; rat), défensines β (homme : HBD1, DEFB118 ; bœuf, souris, rat, porc et volaille), défensines θ (macaque rhésus : RTD-1) • Défensines des insectes : défensine A • SPAG11/isoform HE2C (une défensine β atypique) • Peptides qui contiennent plus de 4 ponts disulfures : drosomycine (drosophiles), défensines antifongiques des plantes
<p>Peptides cationiques et anioniques dérivés de protéines plus grandes</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lactoferricine, dérivée de la lactoferrine • Casocidine 1, dérivée d'une caséine humaine • Domaines antimicrobiens dérivés de la lactalbumine bovine, hémoglobine humaine, lysozyme et ovalbumine

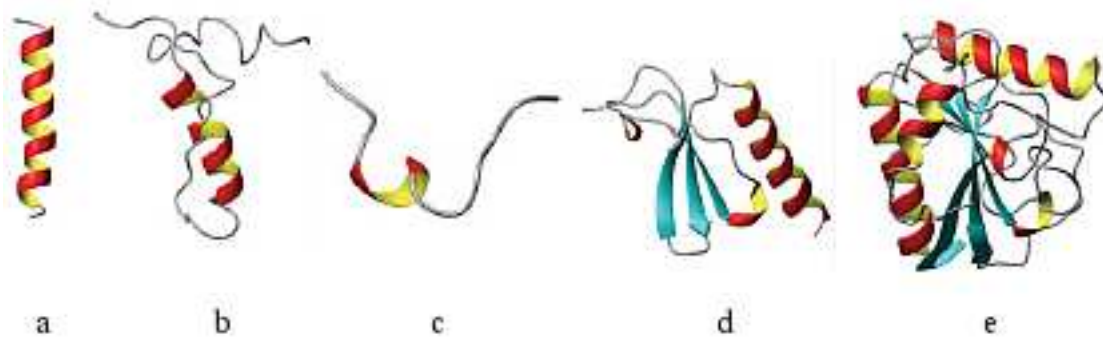


FIG. 6: Les structures protéiques typiques des PAMs classiques. (Yount et al., 2006) **a** : Magainines (*Xenopus*) une structure linéaire en hélice α , **b** : lactoferricine (*Homo*), **c** : Tritrpticine (*Sus*) une structure riche en tryptophane, **d** : kinocidine (*Homo*) une structure α - β contenant des cystéines et ponts disulfures, **e** : PGLYRP-1 (*Homo*) (peptidoglycan recognition protein). Code couleur : rouge/jaune, hélice α ; turquoise, feuillet β ; gris, pelote déroulée (*extended coil*).

Khandelia et Kaznessis, 2007). Ces peptides sont linéaires et peuvent être structurés en forme de pelote déroulée (*extended coil*, FIG. 6c) (Brogden, 2005).

Le quatrième sous-groupe est constitué de 380 peptides cationiques et anioniques qui contiennent des résidus cystéines et plusieurs feuillets β antiparallèles stabilisés par deux ou plusieurs ponts disulfures. Les principaux peptides de ce sous groupe sont la protégrine de leucocytes porcins et la famille des défensines (Ostberg et Kaznessis, 2005; Klotman et Chang, 2006).

Le dernier sous-groupe est constitué de peptides anioniques et cationiques qui sont des fragments dérivés de protéines plus grandes : les peptides dérivés de la lactoferrine (lactoferricine et kaliocine), les peptides dérivés du complément (C3, C3a et C3a-desArg), les kinocidines (les chimiokines antimicrobiennes, CXCL1-4), et les PAMs dérivés des neuropeptides ou NPAMs (neuropeptide Y, substance P et chromogranines) (Brogden et al., 2005; Metz-Boutigue et al., 2003b; Yount et al., 2006; Radek et Gallo, 2007).

2.3 Genèse des PAMs

L'expression des gènes codant pour les PAMs présente différents profils suivant les organismes considérés ainsi que selon le tissu, le peptide et le type cellulaire. Cette expression peut être locale, systémique, constitutive ou bien induite par des facteurs tels que les produits bactériens, les dommages cellulaires et/ou les stimuli inflammatoires (Mookherjee et Hancock, 2007). À titre d'exemple, la défensine hBD-1 est exprimée d'une manière constitutive dans les cellules épithéliales intestinales, tandis que

la synthèse de hBD-2 est induite *via* NF κ B dans les monocytes par l'IL-1 β et dans les cellules épithéliales intestinales par le LPS ou le peptidoglycane (Hertz et al., 2003; Liu et al., 2003; Wang et al., 2003b; Vora et al., 2004). En outre, l'expression d'hBD-2-3 induite par l'IL-22 dans les kératinocytes dépend du facteur de transcription STAT3 (Wolk et al., 2004). Ces données démontrent que la régulation transcriptionnelle des peptides antimicrobiens dépend du type cellulaire et du type de stimulus.

Dans la plupart des cas, l'expression des PAMs est locale : cellules phagocytaires, *epithelia* (cutané, respiratoire, digestif, urinaire, de l'appareil génital), sécrétions chez les animaux ; graines, racines et feuilles chez les plantes. Les insectes font exception à la règle puisqu'ils sont les seuls à produire des peptides antimicrobiens dans le cadre d'une réponse systémique inductible (Hoffmann et al., 1999).

Les PAMs sont exprimés généralement sous forme d'un précurseur qui subira dans un second temps, une maturation protéolytique pour donner naissance à la forme biologiquement active du peptide (Mookherjee et Hancock, 2007).

À titre d'exemple, hCAP-18 (*human cathelicidin antimicrobial protein*), est une des protéines majeures des granules secondaires des neutrophiles polynucléaires, dans lesquels elle est stockée sous forme de précurseur. Suite à sa protéolyse par la protéase-3, le peptide antimicrobien C-terminal, le LL-37, est obtenu (FIG. 7) (Dürr et al., 2006).

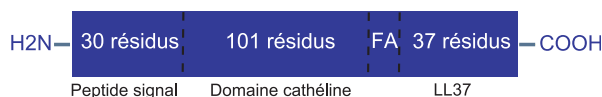


FIG. 7: **Représentation de la cathélicidine humaine (hCAP-18)**. Suite à la protéolyse par la protéase-3, le peptide antimicrobien C-terminal, le LL-37, est obtenu (FA : phenylalanine-alanine).

2.4 Aspects structuraux des PAMs

Les caractéristiques structurales sont la base de la classification actuelle des PAMs. Elles jouent un rôle important dans l'activité antimicrobienne de ceux-ci et déterminent leur mécanisme d'action. La modification d'un de ces éléments structuraux peut améliorer ou diminuer l'efficacité de PAMs.

2.4.1 Propriétés physico-chimiques des PAMs

Bien qu'ils soient isolés d'organismes très différents, les PAMs partagent des propriétés biophysiques qui semblent être essentielles pour une activité antimicrobienne efficace telles que la cationicité, l'amphiphilie et l'hydrophobicité (Yount et al., 2006).

La charge : la plupart des PAMs identifiés sont cationiques avec une charge positive de +2 à +9, mais celle-ci peut aller jusqu'à +12. La cationicité est une propriété impor-

tante pour l'interaction électrostatique initiale entre les peptides et les membranes phospholipidiques (chargées négativement) des bactéries et des champignons. Les surfaces bactériennes sont constituées de plusieurs composantes anioniques telles que le LPS (Gram négatif) et l'acide teichoïque (Gram positif). Chez les champignons, les phosphomannans sont les composants de charge négative de leur surface (Salzman et al., 2004). En plus de cette surface extérieure, les PAMs doivent traverser la membrane plasmique. Contrairement aux membranes plasmiques des eucaryotes constituées de lipides neutres et zwitterioniques (tels que la phosphatidylcholine), celles des bactéries sont riches en acides phospholipidiques tels que le phosphatidylglycerol, la phosphatidylsérine et la cardiolipine qui confèrent une charge négative à la membrane (Yount et al., 2006). En plus des PAMs cationiques, les PAMs anioniques riches en acide glutamique sont isolées du surfactant pulmonaire des humains et des ruminants. Ils ont besoin du zinc en tant que cofacteur pour exprimer leur activité bactéricide contre les bactéries Gram négatives et Gram positives (Fales-Williams et al., 2002). Les études des relations structure–fonction sur l'enkelytine et la dermicidine (les PAMs anioniques) suggèrent que la charge négative et les caractéristiques amphipathiques sont essentielles pour leur activité antimicrobienne (Goumon et al., 1998). Ainsi, il est suggéré que ces deux peptides tuent les microbes en impliquant une structure d'orientation oblique sous forme hélicoïdale (*tilted peptide*) (Dennison et al., 2006). Il s'agit d'une distribution asymétrique de l'hydrophobicité le long de l'axe d'hélice α , de manière à ce que le taux d'hydrophobicité augmente d'une extrémité à l'autre (Lins et Brasseur, 2008). Cette structure permet à une protéine en hélice α une pénétration par un angle léger (45°) et un bouleversement de l'intégrité d'une membrane.

L'amphiphilie : elle est définie en tant que proportion et distribution relative des résidus (ou domaines) hydrophobes et hydrophiles dans une protéine. Le plupart des PAMs sont amphipathiques ou deviennent amphipathiques lorsqu'ils se trouvent dans un milieu anisotrope (Yount et al., 2006). Il a été démontré que dans le cas des peptides synthétiques structurés en hélices α ou feuilletts β ayant une charge et une hydrophobicité identiques, l'augmentation de l'amphiphilie est corrélée avec l'efficacité et l'activité lytique des PAMs (Jin et al., 2005).

L'hydrophobicité : elle traduit la proportion des résidus hydrophobes dans un peptide donné. La plupart des PAMs possèdent une hydrophobicité modérée (d'environ 50 %) ce qui est essentiel pour leur activité antimicrobienne lorsqu'elle indique la partie du peptide intégrée dans la bicouche lipidique de la membrane (Yount et al., 2006). Toutefois, une hydrophobicité excessive diminue la spécificité de l'activité antimicrobienne et augmente la toxicité (contre les cellules mammifères) des PAMs (Zelezetsky et al., 2005). Ainsi, pour une toxicité sélective contre les membranes cellulaires des microbes, un taux modéré d'hydrophobicité est obligatoire.

2.4.2 Structure primaire

La composition en acides aminés est un facteur déterminant pour l'activité antimicrobienne. Parmi les différents acides aminés, lysine, arginine et dans une moindre mesure, histidine, sont susceptibles de donner une charge positive aux peptides (cationicité). Tryptophane, tyrosine, phénylalanine, leucine, isoleucine et méthionine sont responsables de l'hydrophobicité des peptides. L'insertion ou la substitution d'un seul acide aminé peut modifier profondément l'activité antimicrobienne.

Ainsi, à titre d'exemple, l'étude d'un peptide dérivé de la lactoferrine a montré que deux résidus tryptophane sont absolument essentiels pour son activité antimicrobienne (Strøm et al., 2002). De plus, l'incorporation d'un résidu tryptophane supplémentaire augmente l'efficacité de ce peptide en facilitant l'insertion du peptide dans la membrane bactérienne.

2.4.3 Modifications post-traductionnelles

En plus de la modification protéolytique des précurseurs, les PAMs peuvent subir d'autres modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation, la glycosylation, l'ubiquitination. Dans certains cas, l'activité antimicrobienne de ces peptides est liée à de telles modifications. À titre d'exemple, la *O*-glycosylation des peptides riches en proline est nécessaire pour leur activité biologique (Bulet et al., 1999). Plusieurs PAMs glycosylés riches en proline, ont été isolés à partir de l'hémolymphe de drosophile tels que la drosocine (Ser-7 et Thr-11 glycosylées) et l'héliocine (Thr-7) (Rabel et al., 2004). Dans le cas de l'enkélytine (un PAM diphosphorylé dérivé de la proenkephaline-A humaine, la phosphorylation est essentielle pour l'activité antimicrobienne (Goumon et al., 1998). Ainsi, la chromacine (un PAM dérivé de la chromogranine A bovine) est active contre les bactéries, sous les formes phosphorylée et/ou glycosylée (Strub et al., 1996a). L'histone H1A ubiquitinylée a été caractérisée parmi les PAMs présents dans les granulocytes humains stimulés (Wang et al., 2002).

2.4.4 Structure secondaire

En général, les PAMs sont classés en quatre classes structurales : l'hélice α , le feuillet β , la boucle (*loop*) et la pelote déroulée (*extended coil*). Cependant, il existe plusieurs PAMs possédant des structures mixtes, comme la kinocidine (*Homo*) qui a une structure α - β (FIG. 6d). Chez plusieurs PAMs ces structures secondaires sont observées uniquement lorsque le peptide interagit avec les membranes (Jenssen et al., 2006; Yount et al., 2006). À titre d'exemple, l'indolicidine de neutrophiles bovins est non structurée en milieu aqueux mais en présence des membranes ou des éléments semblables à une membrane tels que le sodium dodécyl sulfate (SDS), elle prend la conformation *boat-like* (Hsu et Yip, 2007). La plasticité de la structure secondaire de l'indolicidine

lui permet d'interagir avec différentes molécules (telles que l'ADN) et les membranes. Un autre exemple est celui des plasticines (des PAMs riches en glycine et leucine de la famille dermaseptine) qui adoptent une structure en hélice α ou β -*hairpin-like* à l'interface avec la membrane (El Amri et Nicolas, 2008).

Il existe un motif consensus multidimensionnel, nommé γ -*core*, associé à l'activité antimicrobienne et présent dans toutes les classes de PAMs structurés en feuillet β (Yount et Yeaman, 2004; Yount et al., 2007). Il s'agit d'une structure tri-dimensionnelle constituée de deux feuillets β antiparallèles avec les résidus basiques polarisés le long des axes. La conservation du motif γ -*core* dans la phylogénie, suggère qu'il constitue un archétype structural de la plupart des peptides de défense de l'hôte.

2.5 Spectre anti-infectieux des PAMs

La plupart des PAMs ont un spectre d'activité étendu qui recouvre la majorité des espèces bactériennes et fongiques, voire des virus enveloppés et des protozoaires (Hancock, 2001; Mookherjee et Hancock, 2007). Cependant, des peptides ayant un spectre limité ont également été isolés.

2.5.1 L'activité anti-bactérienne

Les PAMs les mieux étudiés sont ceux possédant une activité antibactérienne (Jenssen et al., 2006). Ils sont généralement actifs contre un large spectre de bactéries (TAB. VI) et plus rarement contre des souches résistantes (MIC 1–4 $\mu\text{g/ml}$) telles que *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* *meticillin-resistant* (Hancock, 2001). Ces peptides possèdent plusieurs mécanismes d'action. Au cours d'une infection, ces mécanismes peuvent être impliqués séparément ou ensembles, tels que la déstabilisation de la membrane cellulaire en combinaison avec l'inhibition d'une ou de plusieurs cibles intracellulaires (Jenssen et al., 2006).

Mode d'action des peptides antimicrobiens

Malgré des cibles et des modes d'action différents, les peptides cationiques antibactériens doivent interagir avec la membrane cytoplasmique des bactéries. Cette phase initiale est constituée d'interactions électrostatiques entre ces peptides et les composantes chargées négativement présentes à la surface des bactéries (Jenssen et al., 2006). D'autres interactions de type ligand-récepteur ont été envisagées pour certains peptides (tels que l'histatine), pour expliquer leur affinité particulière vis-à-vis de certains composants de la membrane bactérienne (Baev et al., 2004). Un mécanisme de formation d'un autorécepteur, intitulé *self-promoted uptake*, a été proposé pour certains peptides (Yount et al., 2006). Il s'agit de la formation d'un récepteur ou d'une structure

2.5. SPECTRE ANTI-INFECTIEUX DES PAMS

TAB. VI: Exemples choisis de peptides antibactériens (Jenssen et al., 2006).

Peptide	Structure	Source(s)	Mécanisme d'action
Magainine	Hélice α	Grenouille	Perméabilisation de la membrane
Cécropines	Hélice α	<i>Hyalophora cecropia</i>	Déstabilisation de la membrane
Mellitine	Hélice α	Abeille	Déstabilisation de la membrane
LL-37	Hélice α	Humain	Perméabilisation de la membrane, antagonisée par les sels
Bufferine II	Hélice $\alpha/extended$	Crapaud	Liaison aux acides nucléiques
Défensines α/β	Feuillet β	Humain, lapin	Membrane cellulaire et cibles intracellulaires ; antagonisées souvent par les sels Inhibition de la synthèse des macromolécules
Protégrine	Feuillet β	Porc	Perméabilisation de la membrane, très puissant
Polyphemusine	Feuillet β	Limule	Translocation dans les cellules, très puissant
Indolicidine	<i>Extended</i>	Bovin	Inhibition de la synthèse des macromolécules Interaction avec calcium/ calmoduline
PR39	<i>Extended</i>	Porcin	Inhibition de la synthèse de l'ADN, l'ARN et des protéines, sans formation de pore

semblable à un canal (*channel-like*) par un premier groupe de peptides, permettant le passage d'autres peptides.

Suite à la fixation des peptides sur la bactérie, la plupart d'entre eux induisent la perméabilisation membranaire par un des modèles suivants :

Le modèle par agrégat (*aggregate model*) : il propose que des agrégats de peptides forment des micelles dans la membrane (FIG. 8A). À l'inverse du modèle des pores torroïdaux, les peptides n'adoptent aucune orientation particulière. Le peptide traverse la membrane lorsque l'agrégat se disperse (Jenssen et al., 2006). La polyphemusine adopte ce modèle pour exercer son activité antibactérienne.

Le modèle des pores torroïdaux (*Torroidal pore, worm hole model*) : les pôles hydrophobes des peptides solidement fixés parallèlement à la paroi, pénètrent entre les phospholipides en déformant la membrane (FIG. 8B). À partir d'un certain seuil, les peptides s'orientent perpendiculairement à la membrane, jusqu'à produire un pore dont les parois sont formées par les peptides et les phospholipides auxquels ils sont associés. C'est le modèle proposé pour les magainines, la mellitine et la LL-37 (Jenssen et al., 2006).

Le modèle des pores en douve de tonneaux (*Barrel-stave model*) : les peptides fixés sur la membrane écartent les têtes hydrophiles externes des phospholipides et pénètrent par leur pôle hydrophobe dans la membrane (FIG. 8C). Lorsqu'un certain seuil est atteint, ces peptides s'assemblent en repoussant les phospholipides et en orientant

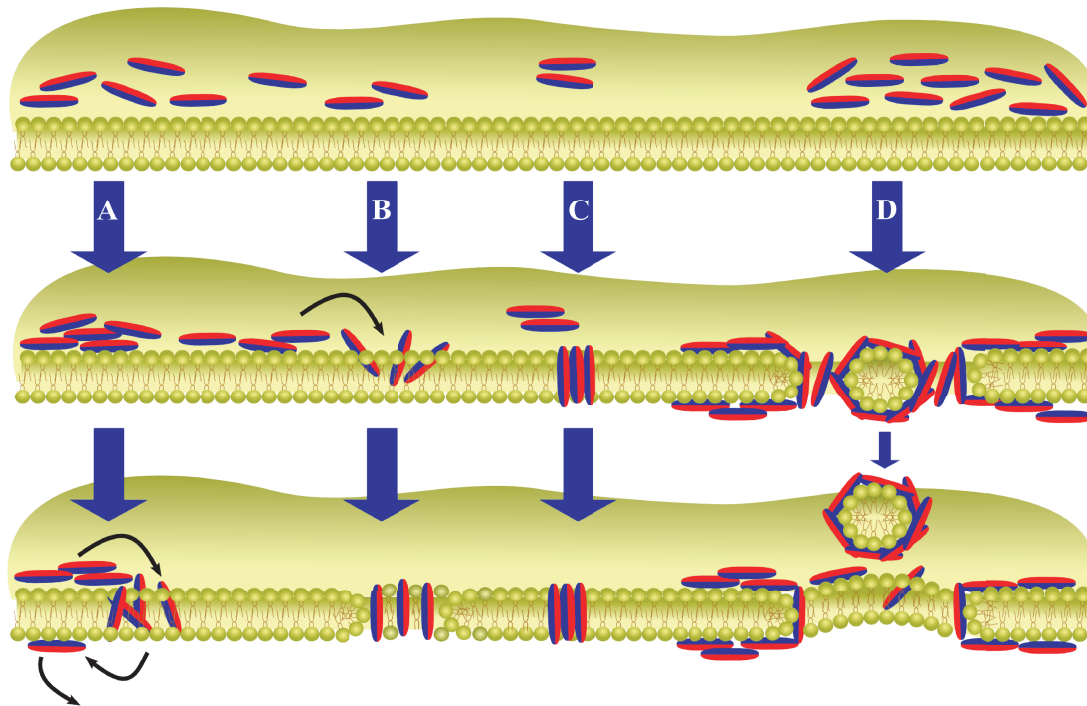


FIG. 8: Les modèles de perméabilisation membranaire par les peptides antibactériens. Les peptides sont présentés en forme de cylindres avec les régions hydrophiles en rouge et les régions hydrophobes en bleu. **A** : Le modèle d'agrégat ; **B** : Le modèle des pores torroïdaux ; **C** : Le modèle des pores en douve de tonneaux ; **D** : Le modèle en tapis (Jenssen et al., 2006).

leur domaine hydrophobe vers ces derniers, créant ainsi un pore dont la paroi interne est tapissée de domaines hydrophiles. C'est le premier modèle proposé pour l'alaméthicine, un PAM non cationique dérivé d'un champignon (Jenssen et al., 2006).

Le modèle en tapis (*carpet-like*) : ce mécanisme repose sur l'accumulation de peptides parallèles à la membrane, formant un tapis qui s'insinue plus ou moins entre les têtes hydrophiles des phospholipides, provoquant des déplacements et des perturbations dans la fluidité de la membrane aboutissant à sa rupture (FIG. 8D). C'est le modèle proposé pour la cécropine P1 (Jenssen et al., 2006).

Les cibles intracellulaires : plusieurs PAMs ont été démontrés comme pouvant traverser la membrane sans l'avoir perméabilisée. Ces peptides s'accumulent à l'intérieur de bactéries où ils ciblent des voies intracellulaires différentes (FIG. 9) telles que la synthèse des acides nucléiques, la synthèse des protéines, l'activité enzymatique et la synthèse de la paroi cellulaire (Brogden, 2005). À titre d'exemple, la dermaseptine inhibe la synthèse de l'ADN et de l'ARN sans déstabiliser la membrane d'*E. coli*.

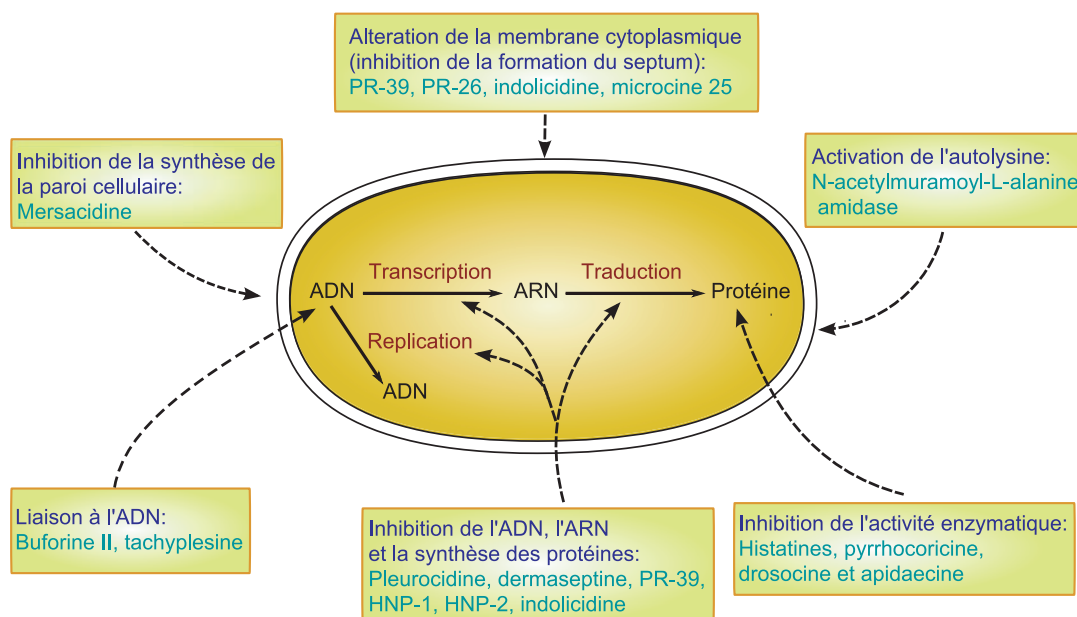


FIG. 9: Modes d'action intracellulaires de l'activité antibactérienne des PAMs (Brogden, 2005). Certains PAMs peuvent traverser la membrane sans l'avoir perméabilisée et ils ciblent différentes voies intracellulaires.

2.5.2 L'activité antifongique

Les PAMs possédant une activité antifongique présentent une grande variété au niveau de leur structure et de leur séquence (TAB. VII). Les peptides antifongiques principaux, tels que ceux isolés de plantes, sont riches en acides aminés polaires et neutres. Bien qu'aucune séquence conservée n'ait été trouvée pour ces peptides, des caractéristiques biochimiques spécifiques telle que la liaison à l'héparine et à la chitine, ont été montrées pour certains d'entre eux (Jenssen et al., 2006). La modification des PAMs non efficaces peut améliorer leur activité antifongique. À titre d'exemple, la magainine conjuguée à l'acide palmitique est très efficace contre les levures et les champignons opportunistes (Malina et Shai, 2005). Le peptide hybride P18, synthétisé par la fusion de différentes parties de la magainine 2 et de la cécropine A, possède une forte activité antifongique contre *Trichosporon beigelii*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum* et *C. albicans* (Lee et al., 2004).

Mode d'action des peptides antifongiques

La plupart des peptides antifongiques provoquent la perméabilisation de la membrane, comme le NP-2 (la défensine α du lapin) ou la mélittine (Jenssen et al., 2006). Cette perméabilisation est énergie indépendante et sel dépendante dans le cas de l'in-

TAB. VII: Exemples choisis de peptides antifongiques (Jenssen et al., 2006).

Peptide	Structure	Source(s)	Cible(s)	Mécanisme d'action
Magainine	Hélice α	Grenouille	<i>C. albicans</i>	Lyse
Cécropines	Hélice α	Ver à soie	<i>A. fumigatus</i>	Liaison à l'ergosterol/cholestérol membranaire
Melittine	Hélice α	Abeille	<i>C. albicans</i>	Perméabilisation
Brévinine	Hélice α	Grenouille	<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>	Lyse
Pn-AMP1	Feuillet β /extended	Plantes	<i>C. albicans</i> <i>S. cerevisiae</i>	Dépolymérisation de l'actine du cytosquelette
Défensine α/β	Feuillet β	Mammifères	<i>C. albicans</i>	Perméabilisation membranaire et/ou lyse
Histatine	Histidine-rich	Humain, primate	<i>C. albicans</i>	Mitochondrie
Indolicidine	Extended	Bovin	<i>T. beigeli</i>	Perturbation de la membrane cellulaire
Tenecine-3	Extended turn	Insecte	<i>C. albicans</i> <i>A. fumigatus</i>	Cible inconnue de localisation cytoplasmique

dolicidine (Shaw et al., 2006). De plus, certains peptides ciblent les éléments intracellulaires : l'histatine 5 (de la salive humaine) est active contre *C. albicans* par une interaction avec la membrane de la mitochondrie (Kavanagh et Dowd, 2004). La chromofungine et la catestatine (les PAMs dérivés de la chromogranine A), se lient à la calmoduline et inhibent l'activité des enzymes dépendantes à la calmoduline dont la calcineurine, une phosphatase importante pour la croissance des filaments (Lugardon et al., 2001; Zhang, 2008).

2.5.3 L'activité antivirale

Les peptides actifs contre les virus se retrouvent dans toutes les classes de PAMs. Le spectre des virus affectés par ces peptides est constitué par les virus à ARN et ADN enveloppés, les adénovirus non enveloppés, le calicivirus félin et l'échovirus 6 (TAB. VIII) (Jenssen et al., 2006). Il semble impossible de prévoir l'activité antivirale des PAMs d'après leur structure secondaire : certains peptides en hélice α , tels que la dermaseptine et la mélittine sont fortement actifs contre le virus de l'herpès simplex (HSV) alors que les cécropines, clavanines et cathélicidines n'ont pas la même efficacité (Jenssen et al., 2006). Plusieurs études ont essayé de décrypter les exigences structurelles liées à l'activité antivirale des PAMs en utilisant leurs analogues synthétiques. L'étude sur

2.5. SPECTRE ANTI-INFECTIEUX DES PAMS

une série des analogues de la lactoferricine a démontré l'importance de l'hydrophobicité, la taille et la distribution (positionnement) spatiale des résidus positifs, sur l'activité anti-HSV de ce peptide (Jenssen et al., 2004, 2005).

TAB. VIII: Exemples choisis de peptides antiviraux (Jenssen et al., 2006).

Peptide	Structure	Source(s)	Cible(s)	Mécanisme d'action
Magainine	Hélice α	Grenouille	HSV	Cible cellulaire
			HIV	Répression de l'expression de gènes viraux
Cécropines	Hélice α	Insecte	Virus Junin	Répression de la synthèse des protéines virales
			HSV	Cible cellulaire
			HIV	Répression de l'expression de gènes viraux
Melitine	Hélice α	Abeille	HSV	Cible cellulaire
			Virus Junin	Cible cellulaire
LL-37	Hélice α	Humain	HSV	Faible inactivation virale
Brévinine	Hélice α	Grenouille	HSV	Inactivation virale
Défensine θ	Feuillet β , cyclique	Humain	IAV	Inactivation des particules virales
			HCMV	Inactivation des particules virales
		Primates	VSV	Inactivation des particules virales
			HIV	Cible cellulaire
			Adénovirus	Inconnu
HSV	Interaction avec la membrane/glycoprotéine et cible cellulaire non héparane sulfate			
Dermaseptine	Feuillet β	Grenouille	HIV	Perturbation de la membrane virale
			HSV	Activité à l'interface virus/cellule
Tachyplésine	Feuillet β	Limule	HIV	Fusion virus/cellule
			HSV	Inactivation virale
			VSV	Enveloppe virale
			IAV	Enveloppe virale
Protégrine	Feuillet β	Humain	HIV	Inconnue
		Porc	HSV	Inactivation virale
Polyphemusine	Feuillet β	Limule	HIV	Liaison à gp120 et CD4
Lactoferricine	β -turn	Humain	HCMV	Activité à l'interface virus/cellule
			HIV	Inconnu
		Bovin	HSV	Blocage de l'héparane sulfate
			Papillomavirus	Activité à l'interface virus/cellule
Indolicidine	<i>Extended</i>	Bovine	HIV	Inhibition de l'intégrase
			HSV	Cibles virales (membrane/glycoprotéine)

Mode d'action des peptides antiviraux

Inhibition de l'entrée virale par l'interaction avec l'héparane sulfate. Les protéoglycanes se trouvent dans tous les types de tissus, la matrice extracellulaire et la surface des cellules de mammifères. Ils sont constitués d'une protéine centrale (*core protein*) et d'une ou plusieurs chaînes de glycosaminoglycanes (GAGs) qui sont les composés les plus anioniques présents à la surface des cellules de mammifères à cause de leur haut degré de sulfatation (Trybala et al., 2004). Cette charge négative élevée leur permet de lier de petits cations, protéines, cytokines et des pathogènes tels que les virus. L'héparane sulfate est le GAG qui joue un rôle crucial dans l'adhérence virale (Spillmann, 2001). Ainsi, le blocage de l'héparane sulfate peut diminuer l'infection virale. Il a été démontré que la défensine α humaine, LL-37 et la magainine interagissent avec les GAGs. De plus, il a été découvert que la lactoferricine possède un domaine spécifique pour se lier aux GAGs (Jenssen et al., 2006).

Le blocage de la propagation du virus dans les cellules avoisinantes. Certains de ces PAMs sont capables d'inhiber la propagation des virus dans les cellules voisines aux travers des jonctions serrées (*tight junction*) ou d'inhiber la formation des cellules géantes (*syncytium*). Ainsi, la défensine α NP-1 du lapin inhibe l'entrée et la propagation virale du HSV (Sinha et al., 2003).

L'inhibition de l'entrée virale par l'interaction avec les récepteurs cellulaires spécifiques. Certains PAMs se lient aux récepteurs spécifiques des virus sur les cellules hôtes. La polyphémusine (analogue T22) se lie au récepteur de chimiokine CXCR4 qui sert de corécepteur pour l'entrée de HIV-1 dans les cellules T (Jenssen et al., 2006).

L'inhibition de l'entrée virale par l'interaction avec les glycoprotéines virales. La retrocyclo-2 (un membre de la famille défensine θ) protège les cellules contre l'infection par HSV-2 en se liant à la glycoprotéine B du virus (Yasin et al., 2004). La retrocyclo-1 se lie à gp120 de HIV lorsque l'enveloppe du virus est glycosylée. Ainsi, cette défensine θ est le premier PAM isolé d'un vertébré ayant une propriété semblable aux lectines (Wang et al., 2003a).

L'interaction avec l'enveloppe virale. L'enveloppe virale est une cible potentielle pour les PAMs. L'indolicidine provoque l'inactivation des particules de HIV-1. Cette interaction est sensible à la température, ce qui suggère un mécanisme impliquant la membrane virale (Robinson et al., 1998). La dermaseptine exerce aussi son activité anti-HIV en perturbant la membrane virale (Lorin et al., 2005).

Les cibles intracellulaires. Certains des PAMs (tels que PR39 et LL-37) sont capables de traverser les membranes cellulaires et nucléaires alors que les autres peuvent être présents d'une manière constitutive dans les vacuoles des cellules hôtes (Jenssen et al., 2006). L'internalisation cellulaire des PAMs peut provoquer les mécanismes antiviraux des cellules hôtes ou bloquer l'expression des gènes/protéines virales (Bowdish et al., 2004). Ainsi, la cécropine A inhibe la multiplication de virus Junin en diminuant la synthèse des protéines virales (Albiol-Matanic et Castilla, 2004).

2.5.4 L'activité antiparasitaire

La magainine 2 est un des premiers PAMs pour lequel une activité anti–protozoaire a été démontrée, contre *Paramecium caudatum* (Zasloff, 1987). Un effet anti–nématode du PMAP–23 (la cathélicidine porcine) a été démontré contre *Cænorhabditis elegans* (Park et al., 2004). Cet effet a été caractérisé comme une interaction directe avec les bicouches lipidiques provoquant la formation de pores et la perturbation membranaire. Récemment, l'histatine 5 a été démontrée comme étant active contre *Leishmania* en ciblant la mitochondrie de ce protozoaire (Luque-Ortega et al., 2008).

2.6 PAMs et peptides vecteurs (*Cell Penetrating Peptides*)

Les peptides vecteurs (*Cell Penetrating Peptides*, CPPs) sont des peptides naturels, synthétiques ou chimériques, capables de traverser les membranes biologiques des cellules selon un mécanisme protéine–indépendant (TAB. IX) encore mal connu (Henriques et al., 2006). Ils sont capables de faire pénétrer des composés thérapeutiques aussi variés que des drogues, des siRNA ou d'autres peptides dans des cellules cibles.

À part leur compétence à accéder à la couche interne des bicouches lipidiques, les CPPs et les PAMs ont plusieurs points communs (Henriques et al., 2006). À concentration élevée, les CPPs sont capables de perturber et perméabiliser les membranes. De plus, certains d'entre eux (tels que la pénétratine, le MAP et le pVEC) présentent une activité antimicrobienne avec une concentration minimale d'inhibition de l'ordre du micromolaire (Palm et al., 2006). D'un autre côté, certains des PAMs (tels que la magainine et la buforine) sont capables d'accéder à leurs cibles cytoplasmiques sans avoir perméabilisé la membrane (Takeshima et al., 2003).

Les CPPs et les PAMs ne peuvent pas être différenciés en fonction de leurs structures parce qu'il existe une grande diversité conformationnelle dans chaque classe de peptides (Henriques et al., 2006). Ils ont toutefois pour caractéristique commune d'être des courts peptides cationiques.

2.7 Résistance des micro–organismes aux PAMs

Les micro–organismes développent différentes stratégies de résistance afin de neutraliser l'action des PAMs. Les produits de l'opéron *dlt* de *S. aureus* réduisent la charge négative de la surface en déplaçant la D–alanine depuis le cytoplasme vers l'acide teichoïque de la membrane (Peschel et al., 1999). Avec l'inactivation de l'opéron *dlt*, *S. aureus* devient sensible aux défensines, protégrines et à d'autres PAMs. *S. aureus* augmente la charge positive de sa membrane anionique en ajoutant de la L–lysine par action

TAB. IX: Séquence et propriétés de quelques peptides vecteurs.

CPPs	Peptide	Origine	Séquence	Référence
NATURELS	TAT (48–60)	Protéine Tat du VIH	GRKKRRQRRRPPQC	(Vivès et al., 1997)
	Pénétratine	Protéine Antennapedia de la Drosophile	RQIKIWFQNRRMKWKK	(Derossi et al., 1994)
	hCT(9–32)	Calcitonine humaine	LGTYTQDFNKFHTFPQTAIGVGAP–amide	(Schmidt et al., 1998)
SYNTHÉTIQUES	Transportan	Galanin(1–12)–Lys–Mastoparan	GWTLNSAGYLLKINLKALAALAKKIL	(Pooga et al., 1998)
	MPG	Séquence NLS + Séquence hydrophobe	GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRRK	(Morris et al., 1997)
	Pep–1	Séquence NLS + Séquence hydrophobe	KETWWETWWTEWSQPKKKRRKV	(Morris et al., 2001)
	Oligo Arginine		(R) _n	(Rothbard et al., 2000)
	MAP	Peptide Amphipathique modèle	KLALKLALKALKAAALKLA–amide	(Oehlke et al., 1998)
DÉRIVÉS DES PAMs	Magainin 2		GIGKFLHSAKKFGKAFVGEIMNS	(Takeshima et al., 2003)
	Buforin 2		TRSSRAGLQFPVGRVHRLLRK	(Park et al., 1998)

de la lysylphosphatidylglycerol (LPG) synthétase (Peschel et al., 2001; Kristian et al., 2003). La mutation du gène codant pour cette enzyme (*mprF*) annule la résistance de la bactérie aux défensines. Les bactéries Gram négatives réduisent leur susceptibilité aux PAMs en diminuant la charge négative totale de leur surface. Pour cela, elles modifient la structure du lipide A (endotoxine) du LPS en ajoutant de l'aminosaccharose, ce qui diminue l'interaction électrostatique entre les PAMs et la membrane des bactéries (Brogden, 2005).

Les bactéries Gram négatives peuvent aussi diminuer la fluidité de la membrane en ajoutant du 2-hydroxymyristate et du palmitate au lipide A, augmentant ainsi les interactions hydrophobes entre les terminaisons acyles des lipides A. La conséquence en est l'inhibition de l'insertion de PAMs et de la formation de pores (Brogden, 2005).

La capsule polysaccharidique constitue un autre système de résistance. Elle limite l'interaction des PAMs avec les membranes, comme dans le cas de résistance de *Kleb-*

siella pneumoniae contre HNP-1, HBD1, la lactoferrine et la polymyxine B (Campos et al., 2004).

L'inactivation protéolytique des PAMs par des enzymes protéolytiques est un mécanisme général de résistance développé par les pathogènes. À titre d'exemple, l'aureolysine (une métalloprotéinase de *S. aureus*) et l'élastase de *P. aeruginosa* peuvent cliver et ainsi désactiver LL-37 (Sieprawska-Lupa et al., 2004; Yount et al., 2006).

Plusieurs évidences indiquent que des mécanismes d'efflux constituent un moyen de résistance développé par les bactéries (Gram positives et Gram négatives) et les champignons pathogènes contre les PAMs (Yount et al., 2006) : il s'agit du pompage actif des PAMs entrés dans les micro-organismes vers l'extérieur. Chez *Yersinia*, ce mécanisme implique un antiporteur de potassium et aide la bactérie à survivre dans les phagolysosomes riches en PAMs.

En plus de ces différents mécanismes de résistance contre les PAMs, les bactéries sont capables de détecter la présence des PAMs, ce qui leur permet de lancer une réponse défensive ciblée (Lai et al., 2007). Récemment un système détecteur a été identifié chez les bactéries Gram négatives ; le système PhoP/PhoQ dirige la modification de LPS afin de diminuer la sensibilité de bactérie aux PAMs (Bader et al., 2005). Il s'agit d'une cascade de transduction du signal constituée d'une kinase membranaire détectrice (PhoQ) et d'un régulateur cytotologique de la réponse (PhoP). L'activation de ce système par les PAMs provoque l'expression des gènes impliqués dans la résistance de bactérie contre les PAMs. Ce système est essentiel pour la virulence de nombreuses bactéries telles que *Salmonella* (Jenssen et al., 2006).

2.8 Activités immunomodulatrices des PAMs

L'activité bactéricide des PAMs est directement liée à leur concentration locale. Chez l'hôte, certains PAMs se retrouvent à de fortes concentrations dans des endroits précis. À titre d'exemple, la concentration des défensines dans les granules azurophiles peut aller jusqu'à 10 mg/ml (Hancock, 2001). Toutefois, chez l'homme, la concentration des PAMs est basse à certains endroits : le fluide de surface des voies respiratoires ne contient que 0,3–8 µg/ml de HBD-2 et 2 µg/ml de LL-37. Bien que la concentration de certains PAMs puisse augmenter au cours d'une infection, elle n'est pas suffisante pour tuer directement les agents infectieux.

Chez les mammifères, l'activité microbicide de plusieurs PAMs est limitée sous certaines conditions physiologiques à cause de leur concentration insuffisante, de fortes concentrations en sel (100 mM pour les cations monovalents et 2 mM pour des cations divalents) et la présence de polysaccharides chargés négativement (tels que l'héparine) (Bowdish et al., 2005). Cependant, malgré de telles conditions, les PAMs possèdent toujours plusieurs fonctions immunomodulatrices, décrites dans les paragraphes suivants,

aussi importantes que l'effet microbicide direct.

2.8.1 Propriétés anti-endotoxines des PAMs

Les réponses inflammatoires sont bénéfiques pour l'hôte dans la lutte contre les pathogènes. Pourtant l'inflammation non contrôlée peut provoquer un syndrome inflammatoire ou sepsis (Mookherjee et Hancock, 2007). Les PAMs de différentes sources telles que CEMA (hybride de la mélittine et la cécropine chez les insectes), LL-37 (humain) et l'indolicidine (bovine) ont été démontrés comme capables de réduire les réponses inflammatoires induites par l'endotoxine et à protéger contre l'endotoxæmia *in vivo* (Bowdish et Hancock, 2005; Fukumoto et al., 2005; Mookherjee et al., 2006).

Les PAMs jouent un rôle dans la balance et régulation des réponses inflammatoires : ils inhibent l'expression des gènes proinflammatoires induite par l'endotoxine, la sécrétion de médiateurs inflammatoires (tels que le TNF- α) et la translocation des sous unités du NF- κ B induite par l'endotoxine. En même temps, ils conservent les autres réponses proinflammatoires telles que la production et la libération des chimiokines provoquant ainsi la suppression sélective de réponses inflammatoires (Bowdish et Hancock, 2005; Mookherjee et al., 2006).

2.8.2 Les propriétés chimiotactiques des PAMs

Suite à l'entrée d'un pathogène, les cellules locales secrètent les chimiokines telles que IL-8 et MCP-1/3 qui attirent des cellules effectrices immunitaires telles que les neutrophiles. Ces dernières libèrent des PAMs tels que les défensines α et LL-37 sur le site d'infection qui attirent d'une manière directe ou indirecte des cellules effectrices comme les neutrophiles, les CD8 immatures et les monocytes/macrophages par un effet chimiotactique (Mookherjee et Hancock, 2007). Ainsi, aux concentrations physiologiques, les PAMs provoquent le chimiotactisme des cellules effectrices immunitaires par l'induction de la production des chimiokines (Dürr et al., 2006; Tjabringa et al., 2006). Dans le cas de LL-37, cette activité implique le N-formyl peptide receptor-like 1 (FPR1), un récepteur couplé aux protéines G (Yang et al., 2000). Les défensines β interagissent avec les récepteurs des chimiokines tels que le récepteur de la protéine-3 α inflammatoire du macrophage (MIP-3 α) sur les cellules immunitaires de l'hôte (Mookherjee et Hancock, 2007).

2.8.3 L'orchestration des fonctions de l'immunité innée par les PAMs

A part les deux rôles mentionnés ci-dessus, d'autres fonctions immunomodulatrices sont attribuées aux PAMs telles que la prolifération et la différenciation cellulaire, l'ex-

2.8. ACTIVITÉS IMMUNOMODULATRICES DES PAMS

tension de la durée de vie des neutrophiles par l'inhibition de l'apoptose, l'activation et la dégranulation des mastocytes, l'angiogenèse et la cicatrisation et l'amélioration de la compétence des CD en tant que cellules présentatrices d'antigène (FIG. 10) (Koczulla et al., 2003; Davidson et al., 2004; Tokumaru et al., 2005; Chen et al., 2006; Nagaoka et al., 2006). Dans l'ensemble, les fonctions immunomodulatrices arbitrées par

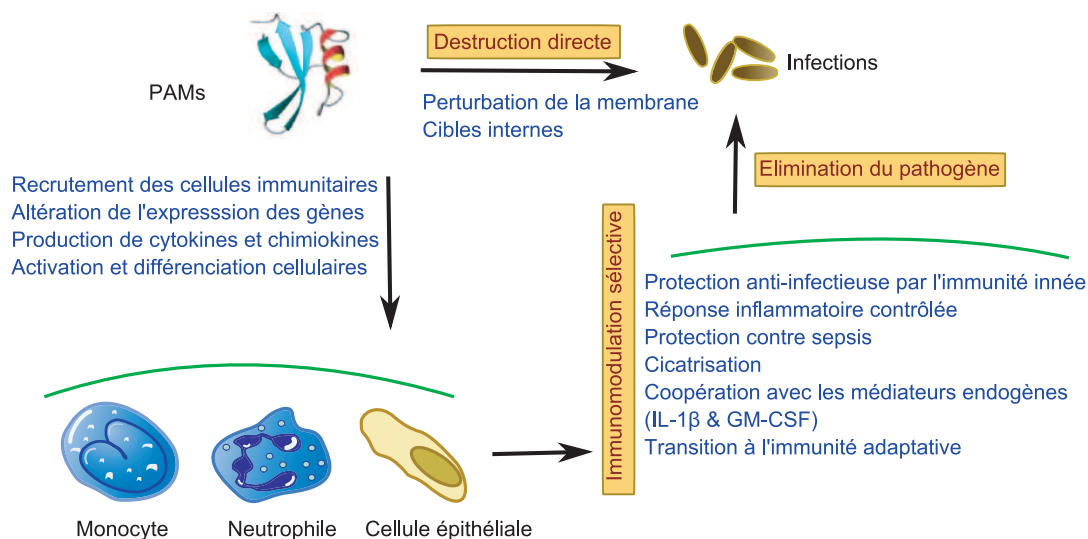


FIG. 10: **Les propriétés anti-infectieuses des PAMs.** Les PAMs protègent contre les pathogènes par leur activité antimicrobienne directe ou en induisant des réponses immunitaires (Mookherjee et Hancock, 2007).

les PAMs ne peuvent pas être considérées indépendamment des autres réponses immunitaires. Les PAMs semblent coopérer avec les autres molécules effectrices de l'immunité, telles que le GM-CSF ou IL-1 β dans le cadre d'un environnement inflammatoire, ce qui aboutit à un réseau complexe de médiateurs immunitaires et la mise en place des voies de signalisation en aval (*downstream*), essentielles pour un mécanisme de défense efficace (Mookherjee et Hancock, 2007).

La cathélicidine humaine (LL-37) et les défensines β , peuvent activer la MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) p38 et ERK1/2 (*Extracellular-signal-Regulated Kinase-1/2*) dans les mastocytes, les kératinocytes et les monocytes (Bowdish et al., 2004; Niyonsaba et al., 2005; Chen et al., 2006). De plus, il a été démontré que LL-37 implique la voie de STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) pour activer les kératinocytes *via* le récepteur de l'EGF, *Epidermal Growth Factor* (Tokumaru et al., 2005).

L'ensemble de ces données indique le rôle direct des PAMs dans l'activation des facteurs de transcription impliqués dans la régulation et l'expression des gènes de l'immunité innée.

2.8.4 Rôle des PAMs dans l'immunité adaptative

Les composantes cellulaires de l'immunité innée recrutées au site d'infection induisent une cascade des médiateurs immunitaires tels que les cytokines, les chimiokines et les PAMs. Ces derniers activent les cellules spécialisées de l'immunité innée telles que les CD immatures. Par la suite, l'activation des lymphocytes T et B provoque l'initiation et le développement des réponses immunitaires adaptatives (Mookherjee et Hancock, 2007).

Différents PAMs tels que les défensines humaines (HNP-1 et HNP-2), les défensines β murines, la cathélicidine porcine (PR-39) et la cathélicidine humaine (LL-37) sont chimioattractives pour les CD immatures et les lymphocytes T (Chertov et al., 1996; Huang et al., 1997; Davidson et al., 2004). Ils peuvent jouer le rôle d'adjuvant en interagissant avec différents récepteurs sur ces types cellulaires ce qui influence la magnitude et la polarisation de la réponse de l'immunité adaptative (Agerberth et al., 2000). À titre d'exemple, les différentes fonctions des défensines sont présentées sur la FIG. 11.

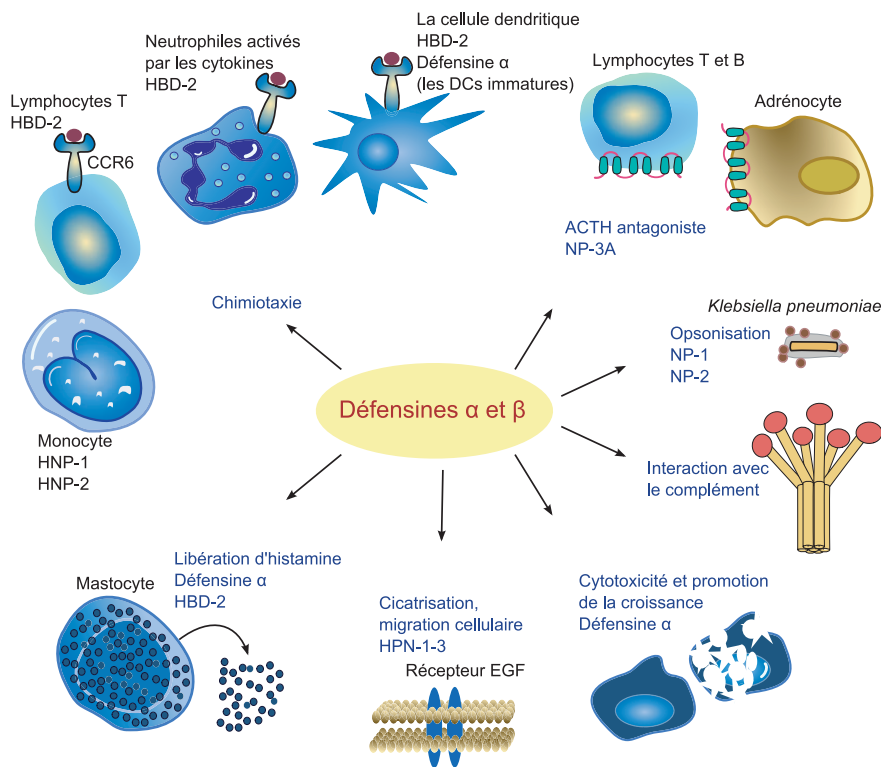


FIG. 11: Les différents rôles des défensines. Outre leur activité anti-microbienne directe, les défensines possèdent différentes fonctions impliquées dans la défense de l'hôte (Lehrer, 2004).

2.8. ACTIVITÉS IMMUNOMODULATRICES DES PAMS

Les études *in vitro* ont démontré que les défensines humaines peuvent accroître la prolifération cellulaire et la réponse de lymphocytes T par l'induction de l'IFN- γ , IL-10 et IL-6, et aussi la modulation de l'expression des molécules costimulatrices (Lillard et al., 1999). Ainsi, LL-37 induit la différenciation de CD8 immature et la polarisation cellulaire en faveur de réponses de type Th1 (Davidson et al., 2004). L'ensemble de ces données indique le rôle des PAMs dans l'interface entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Bowdish et al., 2005).

2.8.5 Les PAMs en tant qu'agents anti-cancer

L'immunité innée joue un rôle important dans la défense précoce contre la croissance de tumeurs malignes et le développement de cancers qui échappent à la surveillance immunitaire (Dunn et al., 2002). En plus de leur activité antimicrobienne, certains PAMs possédant une activité anti-cancer (TAB. X) peuvent être regroupés dans deux catégories (Hoskin et Ramamoorthy, 2008) :

1. Ceux qui sont actifs contre les cellules cancéreuses.
2. Ceux qui sont cytotoxiques pour les cellules de mammifères normales et les cellules cancéreuses.

TAB. X: PAMs possédant une activité anti-cancéreuse (Hoskin et Ramamoorthy, 2008).

Peptide	Source	Structure	Mécanisme d'action anti-cancéreuse
BMAP-28	<i>Bos taurus</i>	Hélice α	Lyse des membranes
HNP-1	<i>Homo sapiens</i>	Feuillet β	Lyse des membranes Anti-angiogénique ?
Lactoferricine B	<i>Bos taurus</i>	Feuillet β	Lyse des membranes Anti-angiogénique ? Induction d'apoptose
LL-37	<i>Homo sapiens</i>	Hélice α	Lyse des membranes
Magainine 2	<i>Xenopus laevi</i>	Hélice α	Lyse des membranes Induction d'apoptose ?
Melittine θ	<i>Apis mellifera</i>	Hélice α	Lyse des membranes Activation de la phospholipase A ₂ (PLA ₂) Activation de la phospholipase D (PLD)
Tachyplesine I	<i>Tachypleus tridentatus</i>	Feuillet β	Liaison à l'acide hyaluronique et l'activation de complément (C1q) Anti-angiogénique ? Induction de la différenciation de cellules cancéreuses

Les membranes des cellules cancéreuses possèdent une charge totale négative à cause de l'expression élevée des molécules anioniques, telles que la phosphatidylsérine et la mucine O-glycosylée ce qui favorise l'interaction électrostatique avec les PAMs. Les autres facteurs favorisant l'interaction sont la fluidité membranaire élevée et la surface cellulaire augmentée des cellules cancéreuses (Hoskin et Ramamoorthy, 2008).

Les avantages d'utilisation des PAMs en tant qu'agents anti-cancer sont bien établis. Ils possèdent un spectre d'activité étendu, ils tuent les cellules cancéreuses rapidement, ils sont capables de détruire les tumeurs primaires, d'inhiber les métastases et n'endommagent pas les organes vitaux (Papo et Shai, 2005).

2.9 Les PAMs dans les pathologies

Plusieurs études ont confirmé l'association entre des taux réduits de PAMs et des conditions pathologiques (TAB. XI). À titre d'exemple, les neutrophiles des patients atteints de la maladie Chediak-Higashi, une affection très rare dont la transmission se fait selon le mode récessif autosomique, manquent de défensine α (Zaiou, 2007). Ces patients subissent des infections bactériennes fréquentes. Dans le cas du syndrome de Kostmann (neutropénie congénitale sévère), les infections orales fréquentes et la parodontite sévère s'associent au défaut d'expression de la cathélicidine (LL-37) et HNP1-3 (Pütsep et al., 2002).

Les infections bronchopulmonaires chroniques à *S. aureus* chez les patients présentant une mucoviscidose sont aussi expliquées par l'inactivation des défensines de l'épithélium bronchique dans le cadre des anomalies du mucus de ces patients (Hiemstra, 2001). De même, les infections des lésions cutanées chez les patients présentant une dermatite atopique sont expliquées par un défaut d'expression des cathélicidines et des β -défensines au niveau de l'épithélium cutané (Gambichler et al., 2006).

Chez les patients atteints de la maladie de Crohn et porteurs d'une mutation du gène de susceptibilité CARD15/Nod2 (*CAspase Recruitment Domain-protein 15/Nucleotide-binding Oligomerization Domain-containing protein 2*), l'expression des gènes codant pour HD-5 et HD-6 est particulièrement abaissée dans les cellules de Paneth. Ce phénomène n'est pas observé chez les patients atteints de la maladie de Crohn sans atteinte iléale (Wehkamp et al., 2005). La diminution d'expression des gènes codant pour HD-5 et HD-6 interviendrait dans l'initiation et/ou l'entretien de l'inflammation et des infections qui caractérisent cette pathologie.

Dans certaines pathologies, malgré l'expression normale ou élevée des PAMs, on observe des surinfections bactériennes. Dans les poumons, les défensines sont principalement synthétisées et excrétées par les cellules épithéliales et les cellules phagocytaires. Certaines sont présentes de façon constitutive, telle HBD-1, tandis que d'autres comme HBD-2, HBD-3 et HBD-4, sont induites par un contact avec des agents pathogènes

2.9. LES PAMS DANS LES PATHOLOGIES

ou des facteurs pro-inflammatoires (Laube et al., 2006). À titre d'exemple, de fortes concentrations en défensines β ont été retrouvées dans les sécrétions respiratoires et les liquides physiologiques de patients souffrant de diverses affections pulmonaires telles que pneumonie, mucoviscidose, bronchite chronique, fibrose pulmonaire idiopathique, syndrome de détresse respiratoire de l'adulte (Bals et Hiemstra, 2004). Pour ce qui est de la mucoviscidose, une inhibition de l'activité antimicrobienne des défensines par de fortes concentrations salines est vraisemblablement impliquée dans la survenue des surinfections bactériennes observées chez ces patients (Zaiou, 2007).

TAB. XI: Expression et fonction potentielle des PAMs lors de différentes maladies inflammatoires (Zaiou, 2007).

Maladie	Peptide	Expression et fonction potentielle
Psoriasis	LL-37, défensines	Sur-expression
Dermatose atopique	LL-37, défensines	Sous-expression (<i>down regulated</i>)
Dermite de contact	LL-37	Sous-expression (<i>down regulated</i>)
Lupus érythémateux disséminé	LL-37	Sur-expression
Acné	MX-594 AN	Inhibition de <i>Propionibacterium acnes</i>
	Granulysine	Élimination de <i>P. acnes</i> , anti-inflammatoire
Parodontite	Défensines	Réduite dans la salive des patients avec candidose
	LL-37	Absente chez les patients avec neutropénie congénitale
	Histatine 5	Protection du desmodonte contre l'infection bactérienne et prévention de la formation de biofilm
Maladie de Crohn	HD5 et HD6	Déficiente dans les cellules de Paneth
	HD5 et HD6	Réduite avec mutation Nod2
	LL-37	Altérée
Colite ulcéreuse	HD5, 6, hBD2-4	Sur-expression (<i>up regulated</i>)
Cancer	Magainine II	Toxique contre les lignées cellulaires tumorales
	Cécropines	Lyse des cellules tumorales
	Lactoferrine bovine	Inhibition de métastases au foie dans le mélanome et le lymphome murin ; cytotoxicité contre les cellules du neuroblastome
Athérosclérose	LL-37	Augmentée dans les lésions humaines
	Défensines	Impliquées dans le métabolisme de lipoprotéines ; activité antifibrinolytique, régulation de l'angiogénèse
Inflammation des articulations	hBD-3, LL-37	Sur-expression (<i>up regulated</i>) dans l'ostéoarthrite

2.9.1 Rôles des PAMs dans l'angiogenèse et la cicatrisation

L'angiogenèse est un processus physiologique fondamental par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins sont formés à partir d'un réseau vasculaire préexistant. Elle est essentielle dans la reproduction, la cicatrisation et le développement embryonnaire. Lors d'une blessure, les neutrophiles et les macrophages sont parmi les premières cellules qui se présentent dans la région blessée. Ils sont les sources majeures de plusieurs facteurs de croissance angiogéniques (tel que VEGF) et les PAMs (tels que LL-37 et les défensines) (Zaiou, 2007). À part son activité anti-infectieuse et chimiotactique, il a été démontré que LL-37 est impliqué dans la réépithélialisation des plaies cutanées (Heilborn et al., 2003). De plus, son taux réduit est associé à la formation des ulcères chroniques de l'épithélium. Les PAMs sont capables d'induire l'angiogenèse : PR-39 (la cathélicidine porcine) provoque l'angiogenèse dans des modèles expérimentaux *in vivo* et *in vitro* (Koczulla et al., 2003; Schaubert et Gallo, 2008). L'injection de ce peptide dans la paroi abdominale de souris induit la formation de nouveaux vaisseaux fonctionnels (Ikeda et al., 2001).

L'angiogenèse joue un rôle important dans la progression du cancer. Très récemment, la surexpression de l'hCAP-18 (et son peptide dérivé LL-37) par les tissus ovariens cancéreux a été démontrée (Coffelt et al., 2008). Par ailleurs, un traitement des lignées de cancers ovariens par du LL-37 recombinant a provoqué la prolifération, le chimiotactisme, l'invasion et l'expression des métalloprotéinases matricielles (MMP). L'ensemble de ces résultats suggère que LL-37 provoque la tumorigenèse ovarienne par la stimulation directe des cellules tumorales, l'induction d'angiogenèse et le recrutement des cellules immunitaires.

2.10 Les peptides synthétiques, ou *designed*

Le répertoire étendu des PAMs naturels fournit une ressource utile en tant que modèle pour développer des PAMs synthétiques. Dans ce contexte, les recherches sur les peptides pour ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques ont permis le développement des nouveaux PAMs avec des acides aminés non standards (*peptail-bols*), les composés peptidomimétiques et les polymères de N-alkylglycine (*peptoids*) (Hancock et Sahl, 2006).

À ce jour, trois approches majeures sont développées pour fabriquer des peptides synthétiques, *designed*, et optimiser leur activité antimicrobienne (Mookherjee et Hancock, 2007) :

- Modification des peptides synthétiques afin d'obtenir ou d'améliorer les structures secondaires amphipathiques et les caractéristiques physico-chimiques compatibles à celles des PAMs naturels (endogènes).
- Mutations aléatoires et truncations des gènes synthétiques codant pour PAMs.

- Synthèses par robots de banques de peptides (*peptide arrays*) par des substitutions systématiques et aléatoires autres que le *peptide scrambling*.

À titre d'exemple, l'activité de l'indolicidine contre les bactéries Gram négatives augmente quand sa forme associée à la membrane est modifiée de manière à ce que ses deux côtés C et N terminaux soient rapprochés (Rozek et al., 2003). Cette nouvelle forme peut être stabilisée en ajoutant des résidus cystéines à chaque extrémité pour obtenir un pont disulfure. De plus cette forme est plus résistante aux protéases.

La modification ou la substitution des résidus peuvent changer le mode d'action d'un PAM. La substitution de la proline par Nlys (résidu *lysine peptoid*) dans les PAMs dérivés de la cathélicidine riches en proline et tryptophane tels que la tritrypticine, change la mode d'action de la perturbation membranaire à l'inhibition des composantes intracellulaires (Zhu et al., 2007).

La synthèse de peptides chimères (constitués de deux PAMs différents) est l'autre approche impliquée afin d'augmenter l'efficacité de PAMs (Rossi et al., 2008). Un des premiers essais a consisté en un peptide hybride de mélittine et cécropine A (Boman et al., 1989). Il a été montré qu'il était plus efficace (30 à 100 fois plus) contre *S. aureus* que la cécropine A. De plus le peptide hybride synthétisé à partir des formes raccourcies de ces deux peptides, reste toujours aussi efficace (Andreu et al., 1992).

2.11 Le futur des PAMs

L'apparition de germes pathogènes résistants aux antibiotiques conventionnels et le développement constant de ces résistances, entraînent un intérêt croissant pour la découverte de nouveaux PAMs en tant qu'agents anti-infectieux.

Il existe plusieurs avantages potentiels pour le développement des PAMs par rapport aux antibiotiques conventionnels :

- Leur petite taille et leur composition relativement simple les rend facile à synthétiser, tout au moins en ce qui concerne les structures linéaires.
- Leur spectre d'activité souvent étendu, avec une forte affinité pour la membrane bactérienne.
- Leur action rapide sur les bactéries et les champignons.
- Leur faible immunogénicité.
- Leur mode d'action particulier qui limite les risques d'émergence de souches résistantes.

Néanmoins, certains facteurs négatifs sont un frein à leur développement, tels que :

- Leur toxicité *in vivo*.
- Leur biodisponibilité et leur stabilité, souvent insuffisantes pour une intervention thérapeutique efficace.
- Leur efficacité comparée *in vitro* et *in vivo*.

- Le coût des traitements, lié à la production et à leur activité spécifique.

Récemment, une défensine appelée plactasine, a été identifiée chez un champignon saprophyte (*P. nigrella*) (Mygind et al., 2005). La plactasine est active *in vitro* et *in vivo* contre *S. pneumoniae* de façon similaire à la pénicilline et à la vancomycine. Les systèmes d'expression fongique actuellement utilisés pour la production de protéines à une échelle industrielle rentable peuvent être utilisés pour la production en masse des PAMS tels que la plactasine (Rossi et al., 2008).

2.12 Les applications thérapeutiques des PAMs

A ce jour, plusieurs PAMs sont développés et utilisés dans des essais cliniques. De plus, certains d'entre eux sont actuellement dans la phase préclinique de développement (TAB. XII). Les deux pionniers sont le MBI-226 (contre les infections liées aux cathéters) et le MX-594AN (contre l'acné), développés à partir de l'indolicidine (Fritsche et al., 2008). Il a été montré que MBI-226 (Omiganan) est capable de diminuer de 40 % la colonisation sur le cathéter et de 50 % les infections du tunnel du cathéter. Ces deux peptides sont dans la phase III d'essai clinique (Jenssen et al., 2006). Le hLF1-11, un peptide dérivé de la lactoferrine humaine, a montré son efficacité contre l'ostéomyélite et les autres infections bactériennes pendant la phase I d'essai clinique (Faber et al., 2005). Un nouveau rince-bouche a été développé contenant l'histatine afin de traiter la candidose orale, le *muguet* (Kavanagh et Dowd, 2004). Il a passé avec succès la phase II d'essai clinique chez les patients atteints de VIH.

La thérapie génique est l'autre approche qui permet d'introduire, d'induire ou d'augmenter l'expression des PAMs en inoculant le vecteur contenant l'ADN codant ceux-ci. La délivrance antivirale de PR-39, a été utilisée avec succès afin d'augmenter la puissance antibactérienne des kératinocytes humains contre les *Streptococci* du groupe A (Lee et al., 2005). De plus, l'introduction du gène PR-39 chez les souris transgéniques, a augmenté leur résistance contre l'infection de peau par ces mêmes *Streptococci*.

La thérapie génique a été utilisée avec succès pour introduire hCAP-18/LL-37 chez les rats ayant des blessures et des brûlures infectées (Jacobsen et al., 2005). Après brûlure, la peau lésée est très sujette aux infections, notamment à *Staphylococcus aureus* et à *Pseudomonas aeruginosa*. Les substituts cutanés, composés de kératinocytes, de fibroblastes et de biopolymères, ont une place importante dans l'arsenal thérapeutique (Supp et al., 2004). Puisque ces substituts cutanés ne sont pas vascularisés, ils sont très sensibles aux bactéries. Les défensines excrétées par les kératinocytes peuvent alors jouer un rôle protecteur du greffon, même si les concentrations ne sont pas suffisantes pour éradiquer à elles seules les bactéries. Les perspectives thérapeutiques ciblant le rôle antibactérien des β -défensines dans les substituts cutanés devraient permettre de moduler le recours aux antibiotiques locaux chez les grands brûlés.

2.12. LES APPLICATIONS THÉRAPEUTIQUES DES PAMS

TAB. XII: Peptides et peptido-mimétiques en cours de développement commercial (Hancock et Sahl, 2006).

Entreprise (Pays)	Médicament	Développement	Indication médicale
AM-Pharma (Bilthoven, Pays-Bas)	hLF-1-11 (dérivé de la lactoferrine humaine)	Phase II	Infections associées à la transplantation allogénique de moelle
BioLineRx (Jerusalem, Israël)	BL2060 (synthétique : un acide gras et copolymères de lysine)	Optimisation	Anti-infectieux
Ceragenix (Denver, USA)	CSA-13 (Stéroïde cationique, céragenine)	Préclinique	Anti-infectieux
Helix Biomedix (Bothell, Washington, USA)	HB-50 (peptide synthétique mimétique de la cécropine)	Préclinique	Anti-infectieux
Helix Biomedix (Bothell, Washington, USA)	HB-107 (fragment de 19 AA de la cécropine B)	Préclinique	Cicatrisation
Inimex (Vancouver, BC, Canada)	IMX942 (peptide de 5 AA)	Optimisation	Immunomodulation ; soins de la fièvre et la neutropénie chez les patients en chimiothérapie
Migenix (Vancouver, BC, Canada)	Omiganan pentahydrochloride/CP-226/MX-226/CLS001 (12-mer analogue de bactolysine)	Phase IIIb/Phase II	Prévention des infections liées aux cathéters ; infections dermatologiques
Novacta Biosystems Ltd. (Hatfield, Angleterre)	Mersacidin (bactériocine)	Préclinique	Infections aux Gram positifs
Novozymes A/S (Bagsvaerd, Danemark)	Plectasin (défensine fongique)	Préclinique	Anti-Gram positif systémique (infections pneumococciques et streptococciques)
Pacgen (Vancouver, BC, Canada)	PAC113 (basé sur la partie active de l'histatine 5 de la salive humaine)	Autorisation IND (<i>Investigational New Drug</i>)	Candidose buccale
PepTx (St. Paul, MN, Etats-Unis)	PTX002 (33-mer peptide), PTX005 (12-mer peptide), PTX006 (analogue N-acylé de PTX005) et PTX007 (analogue non peptidique de PTX005)	Découverte	Anti-endotoxine à spectre large
Polymedix (Philadelphia)	Peptido-mimétiques (dérivés de la série : arylamide, calixarène, hydrazide et salicylamide)	Découverte/Préclinique	Anti-infectieux ; polymères antimicrobiens et <i>coating</i> de matériaux

Lorsque certains des PAMs sont capables de traverser la membrane, ils sont utilisés en tant que modèle pour développer les nouveaux CPPs (Magzoub et Gräslund, 2004). Ainsi, l'utilisation en tant que précurseur des transporteurs de drogues, est une autre application clinique potentielle des PAMs.

Néanmoins aucun des PAMs n'est autorisé jusqu'à présent pour une application clinique, l'efficacité de certains d'entre eux lors des essais cliniques permet cependant d'être optimiste quant à leur utilisation à venir.

Les chromogranines A et B

3 Les chromogranines A et B

3.1 Introduction

Chez les mammifères et les oiseaux, les glandes surrénales sont deux glandes endocrines triangulaires situées au-dessus des reins (FIG. 12). Elles sont principalement responsables de la gestion des situations de stress (*via* la synthèse des corticostéroïdes et des catécholamines) et de l'homéostasie hydro-sodée (*via* la synthèse de l'aldostérone). D'un point de vue anatomique, la surrénale est située en position antérosupérieure par rapport au rein et est irriguée par les artères surrénales. Elle est divisée en deux structures distinctes (FIG. 12) : la *medulla* ou médullosurrénale, d'origine ectoblastique ; le cortex ou corticosurrénale, d'origine mésoblastique. Ces structures sont toutes deux connectées en permanence au système nerveux. La médullosurrénale est située à l'intérieur de la surrénale, alors que la corticosurrénale en recouvre la surface. Formée de cellules dites *chromaffines*, la médullosurrénale sécrète des catécholamines (noradrénaline et adrénaline). Les cellules chromaffines (qui doivent leur nom au fait qu'elles prennent une coloration brune en présence de sels de chrome par suite de la polymérisation des catécholamines qu'elles contiennent) sont de petites cellules présentes dans la médullosurrénale et dans les ganglions du système nerveux sympathique. Elles dérivent de la crête neurale embryonnaire (FIG. 13) et font partie du système neuroendocrine (Unsicker et al., 2005). Les cellules chromaffines de la médullosurrénale sont innervées par le nerf splanchnique. Leur cytoplasme contient un grand nombre de granules de sécrétion 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. Le contenu des granules est libéré dans l'espace existant entre les cellules chromaffines et les cellules épithéliales, pour atteindre la circulation sanguine.

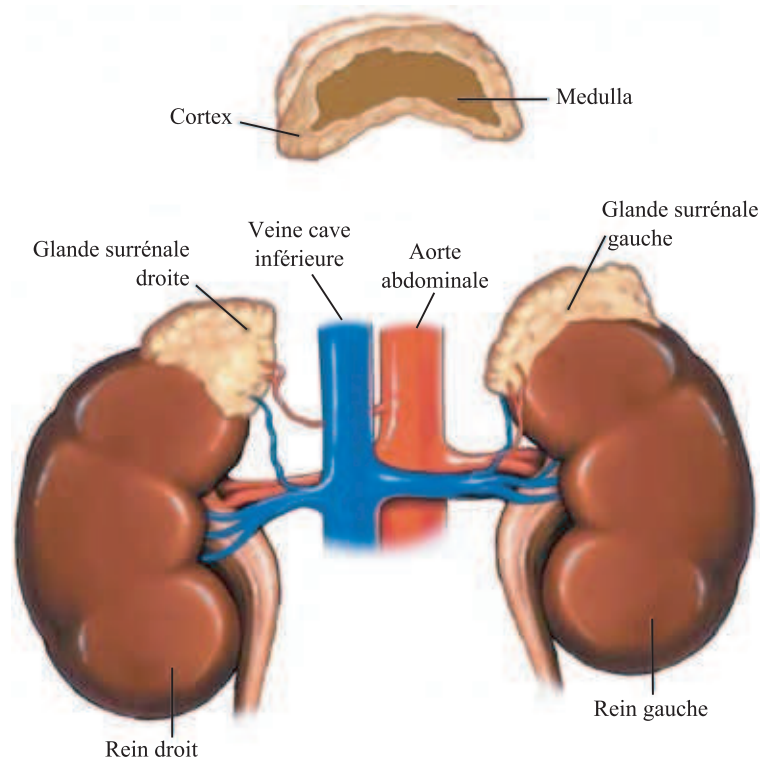


FIG. 12: **Vue antérieure des glandes surrénales.** Les glandes surrénales, situées au niveau du pôle supérieur des reins, sont irriguées par les artères diaphragmatiques inférieures, branches artérielles directement issues de l'aorte abdominale. Les cellules chromaffines sécrètent les neurotransmetteurs directement dans les capillaires de la *medulla*.

3.2 Les granules de sécrétion des cellules chromaffines

La recherche sur les granules chromaffines a impliqué depuis longtemps une interaction constante entre les biochimistes et les morphologistes. En 1953, les biochimistes ont démontré le stockage de catécholamines dans une vésicule subcellulaire (Blashko et Welch, 1953; Hillarp et al., 1953). Les caractéristiques morphologiques de l'organelle *granule chromaffine* ont été identifiées plus tard par la microscopie électronique (Coupand et al., 1964; Lever, 1955). Ces granules de sécrétion endocrine sont similaires aux *Large Dense Core Vesicles (LDCVs)* des neurones (Winkler, 1993) et plus généralement des cellules dérivant de la crête neurale (Le Douarin, 1980). Cependant, les CGs et leurs peptides dérivés sont également présents dans les cellules immunitaires (les neutrophiles) qui les libèrent dans les fluides infectieux (Briolat et al., 2005; Lugardon et al., 2000; Metz-Boutigue et al., 2003a). Le nombre de granules présents est estimé à 7300–41400 par cellule (Huh et al., 2005). Le contenu intragranulaire peut être libéré par les

3.2. LES GRANULES DE SÉCRÉTION DES CELLULES CHROMAFFINES

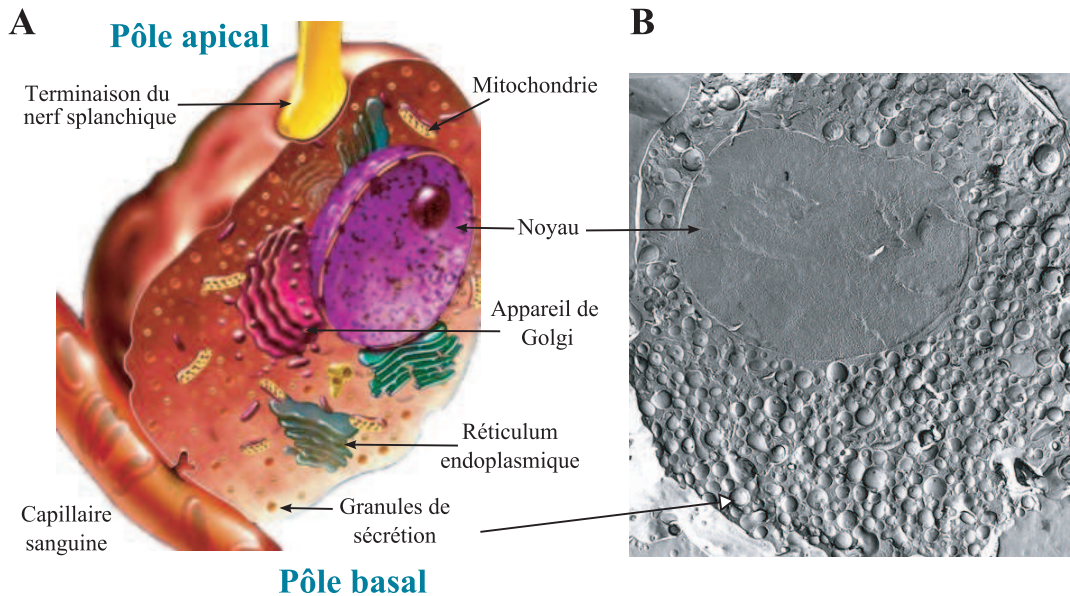


FIG. 13: **Cellules chromaffines.** A : Représentation schématique d'une cellule chromaffine. B : Image en microscopie électronique d'une cellule chromaffine (<http://webpages.ull.es/users/iscb12/ChromaffinCell/Primer.html>). Les granules de sécrétion sont stockés en grand nombre dans le cytoplasme, 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.

faces latérales des cellules chromaffines, permettant ainsi une régulation paracrine ou autocrine entre ces cellules. Cette libération se réalise soit par la fusion complète des granules avec la membrane plasmique (l'exocytose) soit par le mécanisme *kiss and run* (Henkel et al., 2001). Ce dernier permet la libération des neurotransmetteurs par l'ouverture transitoire d'un pore de fusion. Après la fermeture de ce pore, la vésicule se détache ; ce mécanisme *parcimonieux* évite de transférer les protéines vésiculaires vers la membrane plasmique (Palfrey et Artalejo, 2003).

La composition des granules de sécrétion a été déchiffrée avec précision récemment par une étude approfondie de protéomique (Wegrzyn et al., 2007). Les protéines identifiées au niveau de la membrane et la matrice intragranulaire sont regroupées dans plusieurs catégories fonctionnelles qui sont présentées (TAB. XIII).

Ces diverses catégories sont impliquées dans trois systèmes principaux :

1. La production d'hormones, de neurotransmetteurs et des facteurs neuro-humoraux.
2. Le maintien de l'intégrité intragranulaire.
3. Le trafic intragranulaire et l'exocytose.

TAB. XIII: Les catégories fonctionnelles de protéines présentes dans les fractions solubles et/ou membranaires des granules chromaffines (Wegrzyn et al., 2007).

Protéine ou peptide	Soluble	Membranaire
Prohormones, facteurs neuro-hormonaux		
Adrénomédulline	✓	✓
Cathélicidine I	✓	✓
Chromogranine A	✓	✓
Chromogranine B	✓	✓
Chromogranine C	✓	✓
Enképhaline, peptide précurseur	✓	✓
Glycoprotéine II		✓
Glycoprotéine III (clusterine)	✓	✓
NESP-55 (<i>Neuroendocrine Secretory Protein-55</i>)	✓	✓
Neuropeptide Y	✓	✓
Secretogranine III	✓	✓
Protéine de liaison du TGF- β	✓	
VEGF (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)	✓	
VGF <i>Nerve Growth Factor Inducible</i>	✓	✓
Systèmes de protéases		
Carboxypeptidase E	✓	✓
Cathepsine B	✓	
Cathepsine D	✓	✓
Cystatine C	✓	✓
Neuroendocrine protease 7B2	✓	✓
Prohormone convertase 1	✓	✓
Prohormone convertase 2	✓	
ProSAAS	✓	✓
TIMP-1 (<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase I</i>)	✓	✓
Ubiquitine	✓	✓
Enzymes, neurotransmetteurs et transporteurs		
Dopamine β mono oxygenase	✓	✓
FK506 binding protein	✓	
PNMTase (Phenylethanolamine N-Methyl Transférase)	✓	
Tyrosine 3-hydroxylase		✓
Tyrosine-protéine phosphatase		✓

suite...

3.2. LES GRANULES DE SÉCRÉTION DES CELLULES CHROMAFFINES

Tableau XIII, suite

Protéine ou peptide	Soluble	Membranaire
VAT 2 (<i>synaptic Vesicle monoAmine Transporter</i>)		✓
RedOx		
Cytochrome b561	✓	✓
Cytochrome C oxydase		✓
Cytochrome P450	✓	✓
Glutathion peroxydase 3	✓	
Complexe ubiquinol–cytochrome C réductase		✓
ATPase pour la régulation de protéines et le métabolisme de l'ATP		
ANT 1 (<i>Adenine Nucleotide Translocator 1</i>)		✓
APLT (<i>AminoPhosphoLipid Transporter</i>)		✓
ATPase, H ⁺ <i>transporting</i>	✓	✓
ATP H ⁺ <i>transporting</i> VI		✓
ATP Synthase (la chaîne γ)		✓
F1–ATPase		✓
HT028 (ATPase)	✓	
MSTP042		✓
TER ATPase (<i>Transitional Endoplasmic Reticulum</i>)	✓	✓
V–ATPase (<i>vacuolar ATPase accessory subunit B</i>)		✓
V–ATPase (<i>vacuolar ATPase synthase subunit H</i>)	✓	✓
Replieement de protéines		
AHNAK– <i>related protein</i>	✓	
CSP (<i>Cysteine String Protein</i>)		✓
Chaperonine 10	✓	✓
<i>Heat Shock Protein 40</i>		✓
<i>Heat Shock Protein 27</i>		✓
Peptidylprolyl isomérase B		✓
Fonctions liées aux carbohydrates		
Glucosidase II		✓
Golgi sialoglycoprotéine MG–160	✓	
Mannosidase	✓	✓
N–acetylglucosaminyltransferase V		✓
Tetraspanine 7		✓
Fonctions liées aux lipides		
N–acylsphingosine amidohydrolase	✓	

suite...

Tableau XIII, suite

Protéine ou peptide	Soluble	Membranaire
SAP-1 (<i>cerebroside sulfate activator</i>)		✓
Protéines de fixation de GTP et transduction des signaux		
Clathrine	✓	
Protéine G α		✓
Protéine G β		✓
Protéine G γ		✓
<i>Mitogen-activated protein kinase 1 interacting protein</i>		✓
<i>PKCI-1-related HIT protein</i>	✓	
Rab3C		✓
Rab7		✓
Rab14		✓
Rab21		✓
Rab35		✓
<i>Ras homolog gene family, member A</i>	✓	✓
Protéines de l'exocytose		
Synaptophysine		✓
Synaptogamine I		✓
Synaptogamine VII	✓	✓
VAMP3 (Cellubrevine)	✓	✓
Protéines impliquées dans la régulation du calcium		
Annexine A11		✓
Annexine A2	✓	
Annexine A4 (Lipocortine IV)	✓	
Annexine VI (liée au calcium)		✓
Calnucleine (<i>Nucleobindin</i>)	✓	
Protéines structurales		
BMP3 (Ostéogénine)	✓	✓
Décorine (Protéoglycane II de l'os)	✓	✓
<i>Elastin Microfibril Interfacer 1</i>	✓	✓
<i>Myosin, heavy polypeptide 9</i>	✓	
PRBP (<i>Plasma Retinol-Binding Protein</i>)	✓	✓
Taline 1	✓	
Testicane 2	✓	✓
Tubuline		✓

suite...

Tableau XIII, suite

Protéine ou peptide	Soluble	Membranaire
Protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire		
Cortactine 1	✓	✓
Cadhérine neurale	✓	✓
UCC1	✓	
Protéines diverses		
Anticorps anti-testostérone	✓	✓
β_2 -Microglobuline	✓	✓
Antigène CD63		✓
Auto-antigène golgien		✓
HBx (<i>Hepatitis B virus X interacting</i>)		✓
Hémoglobine	✓	✓
Chaîne lourde des Ig	✓	✓
MADH2 (Malate déshydrogénase)	✓	
Pentraxine I neuronale	✓	✓
Nibrine		✓
Transcobalamine II	✓	

Tableau XIII, fin

Ces différents systèmes sont coordonnés entre eux, ce qui permet aux granules de sécrétion de libérer des biomolécules actives impliquées dans la communication cellulaire du système neuroendocrine (FIG. 14).

3.3 La famille des granines

Les chromogranines/sécretogranines (CGs/SGs) qui composent la famille des granines, sont les composants majeurs de la matrice des granules de sécrétion. La chromogranine A (CGA), le premier membre de cette famille, a été révélée par Hillarp en 1958 (Hillarp, 1958). Aujourd'hui, cette famille comprend sept membres : la chromogranine A (CGA), la chromogranine B/sécretogranine I (CGB/SGI), la chromogranine C/sécretogranine II (CGC/SGII), la sécretogranine III, la sécretogranine IV/antigène HISL-19 (SgIV), la sécretogranine V/7B2 (SgV) et la NESP55 (*Neuroendocrine Secretory Protein 55*) (Taupenot et al., 2003).

Les CGs sont des protéines acides et solubles qui possèdent plusieurs sites di- et tri-basiques dans leur séquence d'acides aminés, sites potentiels de clivage protéolytique permettant la génération de nombreux peptides dérivés (Metz-Boutigue et al., 1993). Les propriétés physicochimiques des CGs sont présentées dans le TAB. XIV.

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 res-

TAB. XIV: Propriétés physico-chimiques des chromogranines. Chr : chromosome, Mt : masse moléculaire théorique (kDa), pI : point isoélectrique, Ts : thermostabilité, O-G : O-glycosylation, N-G : N-glycosylation, P : phosphorylation, S : sulfatation, S-S : pont disulfure. Les signes ++ et + représentent une différence d'abondance relative de la propriété ou de la modification considérée.

CG	Espèce	Chr	Résidus	Mt	pI	Ts	Peptides dérivés	S-S	lie :	O-G	N-G	P	S	Références
CGA	Homme	14	439	49	4,5		Vasostatine I, Vasostatine 2,		SgII,					(Benedum et al., 1986)
	Bœuf	21	431	48	4,7		chromofungine, chromostatine,		Plasminogène					(Hutton et al., 1985)
	Rat	6	448	51	4,6	++	Chromacine, Pancréastatine,	+	Ca ²⁺	++	-	+	-	(Krisch et al., 1986)
	Souris	12	445	50	4,6		WE-14, Catestatine, β-granine		hSOD1 (mutée)					(Seidah et al., 1983) (Urushitani et al., 2006)
CGB	Homme	20	657	76	5		GAWK peptide,							(Forss-Petter et al., 1989)
	Bœuf	13	629	71	5,2		Peptide BAM-1745,		IP3R,					(Gerdes et al., 1989)
	Rat	3	655	75	4,9	++	Sécrétolytine,	+	Ca ²⁺ ,	++	+	++	+	(Konecki et al., 1987)
	Souris	2	657	76	5,1		Peptide CCB		hSOD1 (mutée)					(Benedum et al., 1987) (Urushitani et al., 2006)
SgII	Homme	2	590	68	4,7									(Flanagan et al., 1990)
	Bœuf	2	586	67	4,7	++	Secretoneurine, manserine	-	Ca ²⁺	-	-	+	+	(Fischer-Colbrie et al., 1990)
	Rat	9	589	68	4,7		EM-66, AMENM							(Mbikay et al., 1989)
	Souris	1	587	68	4,7									(Gerdes et al., 1989)
SgIII (1B1075)	Homme	15	449	51	4,9				CGA					(Waldbieser et al., 1991)
	Bœuf	ND	ND	ND	ND	ND		-	CPE	ND	-	ND	ND	(Ottiger et al., 1990)
	Rat	18	449	57	4,9				Ca ²⁺					(Linard et al., 1990)
	Souris	9	449	51	4,8									
SgIV HISL-19	Homme			35	5,6									
	Bœuf	ND	ND	35	5,6	ND		ND	ND	ND	-	ND	ND	(Wu et al., 1991)
	Rat			35	5,6									
SgV (7B2)	Homme	15	186	21	5,5	++			PCSK2					(Ischia et al., 1997)
	Bœuf	ND	ND	ND	ND	ND	7B2 ₁₋₁₃₅	-	GTP	ND	-	+	+	(Dopazo et al., 1993)
	Rat	3	186	21	5,5	++	7B2 ₁₅₅₋₁₈₅		Ca ²⁺					(Schimmel et al., 1992)
	Souris	2	186	21	5,5	++								
SgVI NESP-55	Homme	20	245	28	5,3				AVR2, GlucaR					
	Bœuf	13	241	27	5	++	NESP ₁₅₉₋₁₆₂	-	PD2R,	+	-	+	ND	(Weiss et al., 2000)
	Rat	3	256	29	5				LHR, B3AR,					(Hayward et al., 1998)
	Souris	2	253	29	5				CRHR, GNBP					

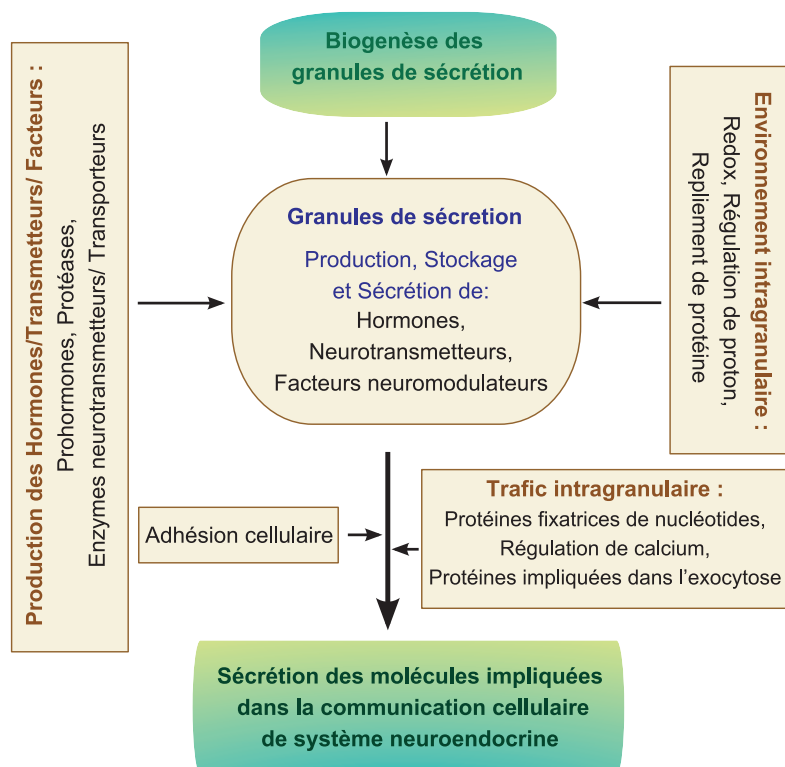


FIG. 14: Représentation des différents systèmes fonctionnels des protéines présents au sein des granules chromaffines (Wegrzyn et al., 2007). La fonction principale des granules chromaffines est la production, le stockage et la libération des peptides bioactifs, des neurotransmetteurs et des facteurs neurohumoraux.

pectivement 40 % et 10 % du matériel cytoplasmique soluble. La SgII ne représente que 2 % du matériel protéique intragranulaire total (Fischer-Colbrie et al., 1987; Wegrzyn et al., 2007).

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 (Fischer-Colbrie et al., 1987).

3.4 Modifications post-traductionnelles

Les CGs sont sujettes à de nombreuses modifications post-traductionnelles au cours de leur transport dans la voie de sécrétion. Ces modifications s'effectuent dans différents compartiments subcellulaires. À titre d'exemple, la formation de ponts disulfures et les N-glycosylations (longues chaînes glycaniques) s'accomplissent au niveau du

réticulum endoplasmique rugueux tandis que les O-glycosylations (tri- et tetrasaccharides), les phosphorylations, les sulfatations et les oxydations ont lieu dans l'appareil de Golgi. L'oxydation des CGs a lieu également dans la matrice des granules où existe un système redox. L'amidation C-terminale et la cyclisation N-terminale sont deux autres modifications post-traductionnelles caractérisées chez les CGs (Tatemoto et al., 1986). Lors de leur stockage dans les granules de sécrétion, les CGs subissent l'action d'enzymes protéolytiques (telles que les prohormones convertases) afin de générer des peptides actifs. Ces clivages protéolytiques ont lieu également au moment de l'exocytose, par la kallikréine (Metz-Boutigue et al., 1993) et dans la circulation sanguine, après sécrétion (Helle, 2004).

3.5 Structure primaire des chromogranines

3.5.1 La CGA

La CGA (FIG. 15), purifiée à partir des granules chromaffines de la médullo-surrénale bovine, possède un point isoélectrique de 4,56 et une masse moléculaire ap-

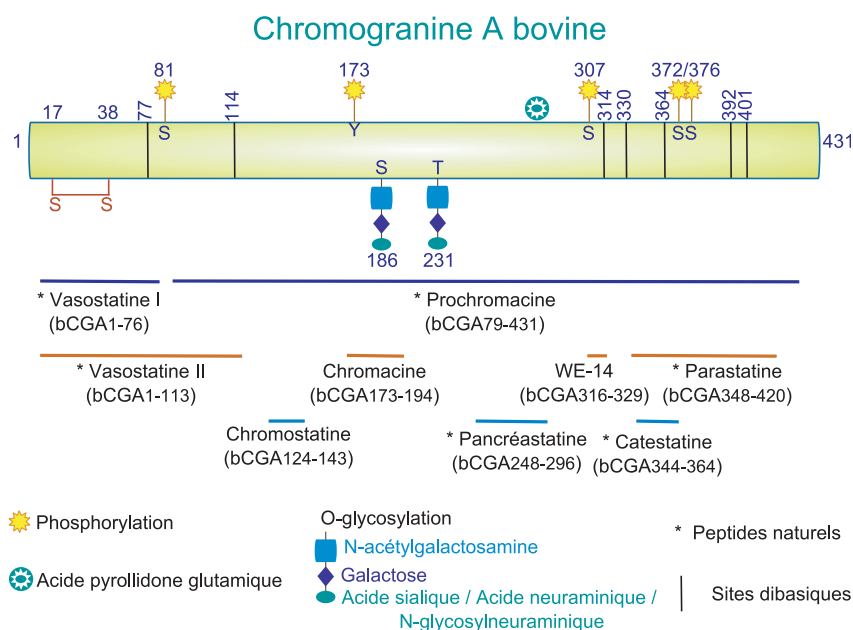


FIG. 15: Localisation sur la séquence de la CGA bovine des modifications post-traductionnelles et des peptides actifs. Séquence (Kang et Yoo, 1997); catestatine (Lee et al., 2003); chromostatine (Galindo et al., 1991); pancréastatine (Nakano et al., 1989); modifications post-traductionnelles (Bauer et al., 1999; Strub et al., 1997).

3.5. STRUCTURE PRIMAIRE DES CHROMOGRANINES

parente estimée par électrophorèse en présence de SDS à 70 kDa tandis que sa masse moléculaire réelle, calculée à partir de la séquence primaire de la protéine mature, est de 48 kDa TAB. XIV. La différence entre ces deux masses résulte des modifications post-traductionnelles et de la charge négative qui perturbe la migration électrophorétique en présence de SDS. Sept sites de modifications post-traductionnelles ont été mis en évidence pour la CGA bovine : deux O-glycosylations et cinq sites de phosphorylation. Les O-glycosylations sont situées au centre de la protéine sur la Ser186 et la Thr231 (Strub et al., 1997). La partie glycanique sur la Ser186 est incluse dans un peptide antibactérien nommé chromacine (Strub et al., 1996a). Quatre sites de phosphorylation sont présents sur des résidus sérine en position Ser81, Ser307, Ser372 et Ser376 et un cinquième est localisé sur le résidu Tyr173. Concernant la CGA humaine (FIG. 16), les

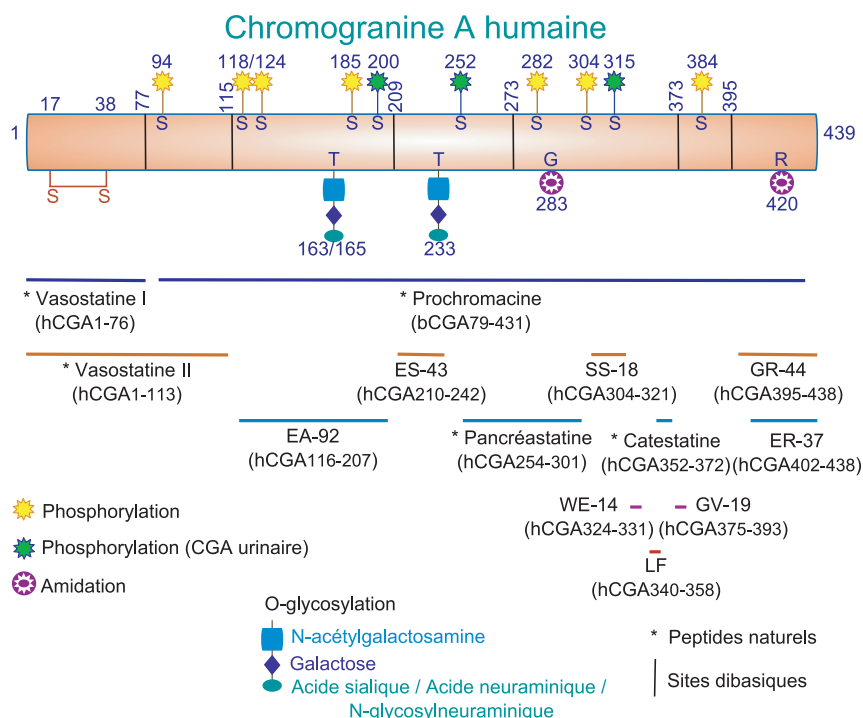


FIG. 16: Localisation sur la séquence de la CGA humaine des modifications post-traductionnelles et des peptides actifs Séquence (Konecki et al., 1987) ; séquence et peptides (Orr et al., 2002) ; modification post-traductionnelles de la CGA urinaire (Gadroy et al., 1998), modifications post-traductionnelles de la CGA dans l'hypophyse (Beranova-Giorgianni et al., 2006; Giorgianni et al., 2004).

modifications post-traductionnelles ont été caractérisées par notre laboratoire à partir de la CGA excrétée dans les urines de patients atteints de carcinomes. Ainsi, trois sites de O-glycosylation (Thr163, Thr165 et Thr223) et trois sites de phosphorylation (Ser200, Ser252 et Ser315) sont identifiés (Gadroy et al., 1998).

Récemment, des analyses protéomiques de la glande hypophysaire humaine ont permis de caractériser sept sites de phosphorylation (Ser94, Ser118, Ser124, Ser185, Ser282, Ser304 et Ser384) sur la CGA humaine (Beranova-Giorgianni et al., 2006; Giorgianni et al., 2004). Ces résultats indiquent que les modifications post-traductionnelles de la CGA sont tissu dépendantes.

Les parties N-terminale (résidus 17–38) et C-terminale (résidus 407–431) sont les deux régions les plus conservées de la CGA ce qui suggère un rôle fonctionnel important. La région N-terminale de la CGA (résidus 1–39) est responsable de l'interaction pH-dépendante de celle-ci avec la membrane du vésicule (Kang et Yoo, 1997). De plus, cette région (résidus 40–65) est importante pour l'interaction calcium dépendante de la CGA et la calmoduline (Yoo, 1992). La partie C-terminale est impliquée dans l'oligomérisation de la CGA (Yoo et Lewis, 1993) : la CGA présente un équilibre monomère/dimère (pH 7,5) ou monomère/tétramère (pH 5,5) d'une manière pH et calcium dépendantes (Yoo et Lewis, 1992).

3.5.2 La CGB

La CGB bovine (FIG. 17) possède 626 résidus et un point isoélectrique de 5,2. La

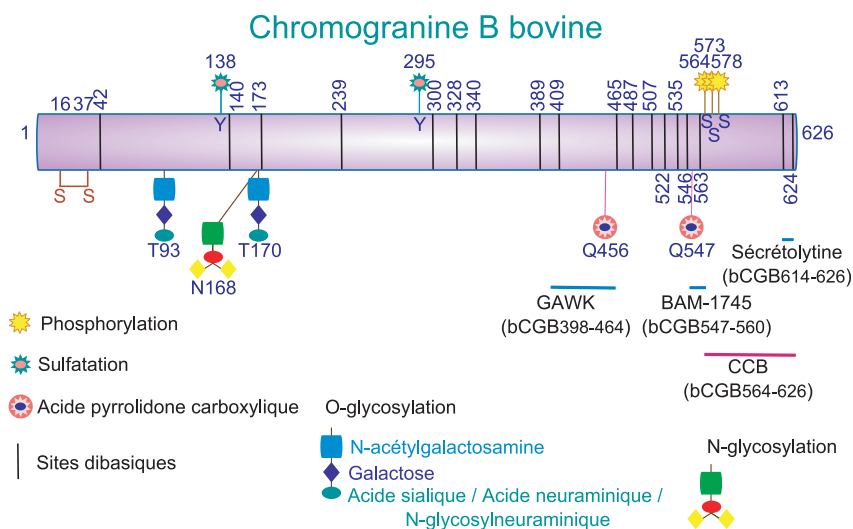


FIG. 17: Localisation sur la séquence de la CGB bovine des modifications post-traductionnelles, des sites dibasiques et des peptides dérivés (Gasnier et al., 2004).

différence entre la masse moléculaire théorique (76 kDa) et la valeur estimée sur gel SDS-PAGE (100 kDa) résulte, comme pour la CGA, de la présence de nombreuses modifications post-traductionnelles (TAB. XIV) et de l'abondance de résidus acides (24 %) (Gasnier et al., 2004). Le pont disulfure de la région N-terminale de la CGB

est essentiel pour l'interaction de la CGB avec les membranes du réseau trans-golgien (Glombik et al., 1999). Plusieurs peptides de la CGB ont été identifiés dans des extraits tissulaires d'hypophyse humaine, de phéochromocytomes humains, de cerveaux de rat, du nerf splanchnique de porc et de liquide céphalorachidien humain (Benjannet et al., 1985; Conlon et al., 1992; Depreitere et al., 2002; Marksteiner et al., 1999; Stark et al., 2001). De façon similaire à la CGA, la partie N-terminale de la CGB (résidus 1-49) qui est impliquée dans l'interaction avec la membrane de la vésicule est très conservée (Yoo et Kang, 1997).

3.6 Localisation des chromogranines

La distribution tissulaire des CGs (Huttner et al., 1991; Taupenot et al., 2003) et de leurs ARNs messagers (Mahata et al., 1993, 1991) a été le sujet de différentes études. La majorité des cellules endocrines et neuroendocrines expriment au moins un membre de cette famille de protéines acides. Les cellules hypophysaires, les cellules C de la thyroïde, les cellules de la parathyroïde, les cellules chromaffines et les cellules neuroendocrines des tractus gastro-intestinal et pulmonaire produisent et stockent les CGs dans des granules de sécrétion (Montero-Hadjadje et al., 2008).

Le gène et la protéine de la CGA sont exprimés également dans la glande submandibulaire humaine. La présence de CGA dans la salive est décrite comme un marqueur de stress physiologique. L'association entre le taux élevé de la CGA et l'intensité de la parodontite a été démontrée récemment (Hironaka et al., 2008). La CGA a été détectée dans les granules de sécrétion des cellules séreuses et ductales, comme par exemple au niveau des glandes salivaires humaines et elle est sécrétée dans la salive (Saruta et al., 2005). La présence de la CGA dans les testicules bovins suppose son implication dans la régulation de la spermatogenèse (Payan-Carreira et al., 2006). En outre, une étude réalisée dans notre équipe a conduit à la caractérisation des peptides dérivés de la CGA (CGA4-113, CGA1-124, CGA1-135 et CGA1-199) dans le cœur du rat indique un rôle dans la physiologie cardiaque (Glattard et al., 2006).

L'abondance relative des chromogranines est tissu, stade du développement et espèce dépendante. La CGA humaine est exprimée de manière prédominante dans la médullosurrénale, l'hypophyse et le tractus gastro-intestinal (Winkler et Fischer-Colbrie, 1992). La localisation tissulaire de la CGB est similaire à celle de la CGA. La CGB humaine s'exprime dès le début de la vie embryonnaire : elle a été retrouvée dans le cerveau de fœtus (Bitsche et al., 2006). 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 (Fischer-Colbrie et al., 1987).

3.7 Fonctions biologiques des chromogranines

Depuis leur découverte en 1958, plusieurs études se sont focalisées sur les rôles des CGs dans l'emballage des hormones et la formation des granules de sécrétion (Chanat et Huttner, 1991). De plus, les CGs sont des précurseurs de nombreux peptides dérivés ayant des effets hormonaux autocrines, paracrines et endocrines (Eiden, 1987; Fischer-Colbrie et al., 1995; Taupenot et al., 2003).

3.7.1 Fonctions intracellulaires des chromogranines

Genèse des granules de sécrétion

En 2001, Kim et al. ont apporté la preuve d'une hypothèse ancienne : la CGA joue un rôle crucial dans la biogenèse des granules de sécrétion dans les cellules neuroendocrines (Kim et al., 2001). L'inhibition de l'expression de CGA dans les cellules PC12 provoque une diminution importante de la formation de granules de sécrétion et de la libération des hormones. Récemment, il a été démontré que dans les cellules PC12, la CGA provoque la biogenèse des granules de sécrétion par son motif granulo-génique, le domaine CGA40–115 (Courel et al., 2006). D'autres études ont démontré que la CGB (Huh et al., 2003) et la CGC (Beuret et al., 2004) sont également capables d'induire la formation des structures granulaires (*granule-like*) dans des cellules non-neuroendocrines qui sont dénuées de la voie de sécrétion. Tous ces résultats montrent que les CGs peuvent avoir un rôle déterminant dans la génération des granules de sécrétion (Miyamasu et al., 1998).

Récemment, il a été démontré que la CGA induisait la régulation positive de l'expression de la protéase *nexine-1*, un inhibiteur des sérine protéases, ce qui a pour effet de stabiliser et protéger les protéines des granules contre la dégradation protéique (Kim et Loh, 2006).

Libération du calcium

Les granules de sécrétion des cellules chromaffines contiennent du calcium à une concentration de 40 mM (Haigh et al., 1989). La plupart du calcium intragranulaire (>99,9 %) est lié aux CGs et une partie minoritaire (<0,1 %) existe en tant que calcium libre (Bulenda et Gratzl, 1985). La CGA et la CGB sont capables de lier le calcium (50–100 mol de calcium/mol de CGs) ce qui montre l'implication de la CGA et la CGB dans l'immobilisation intracellulaire et la libération de calcium (Yoo et al., 2000). En outre, elle interagissent avec le récepteur de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3R) présent sur les membranes des granules et le canal calcique couplé, au pH intragranulaire de 5,5 (Yoo et al., 2000). Cette interaction change la conformation de ces derniers et module

l'activité de canaux calciques, contrôlant ainsi la concentration intragranulaire en calcium. Contrairement à la CGA, la CGB reste liée au IP3R/Ca²⁺ à pH 7,5 et l'activation des canaux est persistante (Thrower et al., 2003).

3.7.2 Fonctions extracellulaires des chromogranines

Peptides dérivés de la CGA

La pancréastatine (bCGA₂₄₈₋₂₉₆) est le premier peptide dérivé de la CGA qui a été isolé et caractérisé avant l'identification de la CGA. Elle est capable d'inhiber la libération d'insuline par les cellules β du pancréas, stimulée par le glucose, ainsi que la sécrétion de l'hormone parathyroïdienne (Tatemoto et al., 1986; Fasciotto et al., 1989). Les études récentes, ont montré *in vivo* que le taux de pancréastatine est élevé chez les diabétiques et que le variant G397S (glycine 397 mutée en serine) a le pouvoir d'inhiber la libération de glucose (O'Connor et al., 2005). Ainsi, la pancréastatine est considérée comme un peptide capable de maintenir le taux de glucose plasmatique.

Les vasostatines I (bCGA₁₋₇₆) et II (bCGA₁₋₁₁₃) sont deux fragments situés dans le domaine N-terminal de la CGA. Elles antagonisent la contraction des muscles lisses médiée par l'endothéline dans les régions vasculaires (Aardal et al., 1993). De ce fait, la vasostatine I serait un nouveau peptide cardiorégulateur chez les mammifères (Cerra et al., 2006). L'adhésion des fibroblastes stimulés par la vasostatine I fait aussi partie de la réponse myocardique suite à une crise cardiaque (Corti et al., 2004). La vasostatine I exerce une action inotropique négative sur le cœur d'anguille (Imbrogno et al., 2004) et le cœur isolé de rat (Gallo et al., 2007; Tota et al., 2007). 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 al., 1998).

Deux peptides dérivés de la vasostatine I, CGA₄₋₁₆ et CGA₄₇₋₆₆ (chromofungine), ont été décrits par notre équipe 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 al., 2004a). Il a été montré que le 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 al., 2004b). De plus, *in vivo*, le peptide CGA₄₋₁₆ aurait un rôle protecteur ; il 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 al., 2004c, 2005).

Récemment, il a été montré que la chromofungine (bCGA₄₇₋₆₆) est capable de provoquer l'entrée de calcium et la dégranulation des neutrophiles humains, ce qui indique pour la première fois son rôle immunomodulateur (Zhang, 2008).

La catestatine (bCGA_{344–364}) est un inhibiteur endogène de la transmission cholinergique nicotinique, fonctionnant d'une manière autocrine/paracrine dans la commande négative de rétroaction de la sécrétion des catécholamines (Mahata et al., 2004). Il existe trois variants humains naturels de la catestatine (hCGA_{352–372}) : G364S, P370L, R374Q. L'étude de ces variants met en avant l'existence de variations interindividuelles dans la signalisation nicotinique humaine (Mahata et al., 2004). La catestatine est un puissant vasodilatateur *in vivo* chez le rat en stimulant la libération de l'histamine (Kennedy et al., 1998). Plus récemment, il a été montré que la catestatine peut stimuler les mastocytes induisant la libération de l'histamine par ces cellules (Krüger et al., 2003).

Le taux de catestatine sanguine diminue dans les cas d'hypertension essentielle. De plus, l'ablation génétique du gène de la CGA chez les souris, induit une augmentation de la pression sanguine qui est réversée par le prétraitement des souris KO par la catestatine (Angelone et al., 2008). L'ensemble de ces résultats suggère le rôle direct de la catestatine comme régulateur endogène de la fonction cardiaque et de la pression sanguine (Mahapatra, 2008).

Il faut noter que la catestatine et la pancréastatine sont uniquement caractérisées chez les mammifères car elles sont soit absentes, soit peu conservées dans le modèle batracien (Montero-Hadjadje et al., 2008). Cette observation suggère qu'elles sont apparues tardivement au cours de l'évolution et/ou que la séquence initiale a été fortement modifiée en réponse aux pressions de sélection particulières subies par les mammifères.

Peptides dérivés de la CGB

La sécrétolytine (bCGB_{614–626}) a été isolée en 1995 par notre équipe, dans le milieu de sécrétion de cellules chromaffines stimulées (Strub et al., 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 activité antimicrobienne. Le CCB (bCGB_{564–626}) est l'autre peptide dérivé de la CGB qui possède une activité antimicrobienne (Strub et al., 1995). Il s'agit de la forme précurseur de la sécrétolytine.

La fonction biologique des autres peptides dérivés de CGB, tels que GAWK (Benjannet et al., 1985), BAM-1745 (Flanagan et al., 1990), SR-17 (Wang et al., 2001), HQ-34 (Wang et al., 2001) et PE-11 (Laslop et al., 1998) n'est pas connue. Ce dernier est exprimé dans le noyau solitaire du nerf vague du fœtus humain, probablement jouant un rôle dans le développement fœtal (Bitsche et al., 2006).

3.8 Peptides antimicrobiens dérivés des chromogranines

En plus des fonctions mentionnées dans la partie précédente, certains des peptides dérivés des CGs possèdent des activités antimicrobiennes. En 1995, le premier PAM dérivé de la CG, la sécrétolytine (bCGB₆₁₄₋₆₂₆) a été isolé et caractérisé dans les granules des cellules chromaffines (Strub et al., 1995). Depuis, de nombreux PAMs dérivés des CGs sont identifiés dans les granules de sécrétion des cellules chromaffines bovines et accompagnent d'autres PAMs dérivés de la proenképhaline A et de l'ubiquitine (TAB. XV) (Goumon et al., 1998; Kieffer et al., 2003).

TAB. XV: Peptides antimicrobiens dérivés des CGs.

CG	Peptide	Bactéries Gram ⁺	Bactéries Gram ⁻	Champignon	Levure	Parasite	Références
CGA	Vasostatine I (bCGA ₁₋₇₆)	✓		✓	✓		(Lugardon et al., 2000)
	Chromofungine (bCGA ₄₇₋₆₆)			✓			(Lugardon et al., 2001)
	Prochromacine (bCGA ₇₉₋₄₃₁)	✓	✓				(Strub et al., 1996a)
	Chromacine (bCGA ₁₇₃₋₁₈₆)	✓					(Strub et al., 1996a)
	Catestatine (bCGA ₃₄₄₋₃₆₄)	✓	✓	✓	✓	✓	(Briolat et al., 2005)
CGB	Sécrétolytine (bCGB ₆₁₄₋₆₂₆)	✓					(Strub et al., 1996b)
	CCB (bCGB ₅₆₄₋₆₂₆)	✓					(Metz-Boutigue et al., 1998)

L'activité antimicrobienne de la sécrétolytine est directement reliée à sa structure en hélice α (Strub et al., 1996b). Des peptides homologues de la sécrétolytine ont été localisés dans différentes espèces, telles que la sangsue (Salzet et Verger-Bocquet, 2002), le porc (Wang et al., 2001) et l'homme (Tasiemski et al., 2002). Aucune activité antibactérienne n'a été détectée pour le fragment porcin de la sécrétolytine (KR-11, pCGB₆₃₇₋₆₄₇). Le changement d'un résidu d'acide aminé (Thr/Asn) serait responsable de la perte d'activité antibactérienne (Depreitere et al., 2004).

La vasostatine I (bCGA₁₋₇₆) présente des propriétés antimicrobiennes (Lugardon et al., 2001, 2000). Elle tue les bactéries à Gram positif aussi bien qu'une large variété

de champignons et de levures, avec une concentration minimale d'inhibition (CMI) de l'ordre du micromolaire, sans pour autant partager d'homologie structurale avec les classes connues de peptides antibactériens.

La prochromacine (bCGA₇₉₋₄₃₁) est active contre des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Lorsqu'il est digérée par l'endoprotéinase Lys-C, ce peptide peut être le précurseur d'un plus petit peptide, la chromacine (bCGA₁₇₃₋₁₈₆), plus actif contre les bactéries à Gram positif, mais ayant perdu son activité contre les bactéries à Gram négatif. Ce petit peptide est actif exclusivement sous les formes glycosylées et phosphorylées (Strub et al., 1996a).

La catestatine (bCGA₃₄₄₋₃₆₄) a montré une activité antimicrobienne très forte et une spectre d'activité assez large puisqu'elle s'est révélée active contre différentes souches de bactéries à Gram positif et à Gram négatif ainsi que contre différents champignons filamenteux et levures (Briolat et al., 2005). C'est le premier peptide dérivé des CGs qui possède une activité antiparasitaire contre plasmodium (Thèse d'Aziza AKADAR, Strasbourg 2008).

En plus de ces peptides, il existe d'autres PAMs au sein des granules chromaffines tels que l'ubifungine, dérivée de l'ubiquitine, et l'enkélytine, dérivée de la proenképhaline A (Goumon et al., 1996; Kieffer et al., 2003). La présence de l'ubiquitine en tant que PAM est un résultat inattendu qui a justifié la poursuite de ces travaux dans une partie de ma thèse. L'ubiquitination est une modification covalente des protéines qui les entraîne dans la voie du protéasome pour une digestion protéolytique. Elle est aussi impliquée dans les mécanismes de trafic intracellulaire. Ces différents aspects seront présentés dans le prochain chapitre.

Découverte de l'ubiquitine et des protéines apparentées

4 Découverte de l'ubiquitine et des protéines apparentées

La diversité fonctionnelle du protéome d'un organisme peut être accrue de façon importante par de nombreuses modifications post-traductionnelles covalentes telles que phosphorylations, méthylations, glycosylations ou acétylations. De plus, les protéines entières peuvent être liées d'une manière covalente à d'autres substrats protéiques. L'exemple classique d'une protéine capable de modifier les autres protéines est celui de l'ubiquitine, une protéine de 76 résidus qui est fortement conservée au cours de l'évolution chez les eucaryotes, mais absente chez les bactéries et les archées (Kerscher et al., 2006).

Parmi les nombreuses fonctions de l'ubiquitine, la plus étudiée concerne l'adressage des protéines vers la voie du protéasome (un complexe enzymatique multiprotéique) pour dégradation. Pour ceci, l'ubiquitine est attachée au substrat sous la forme d'une chaîne de polyubiquitine, qui est reconnue par des récepteurs spécifiques dans le protéasome ou par des protéines adaptatrices qui se lient au protéasome par la suite (Elsasser et al., 2002; Young et al., 1998).

Depuis la découverte de l'ubiquitine en 1966 (Goldstein et al., 1966), une famille de petites protéines apparentées à l'ubiquitine (dites *ubiquitin-like proteins*, *Ubls*) a été identifiée TAB. XVI. Les Ubls ne possèdent pas forcément de séquences homologues, mais toutes possèdent la même structure tridimensionnelle : *ubiquitin fold* ou β -*grasp fold* (Hochstrasser, 2000). De plus, le résidu C-terminal des Ubls capable de s'attacher aux protéines d'une manière covalente, est une glycine qui se lie au substrat par son groupement carboxyl (Kerscher et al., 2006). Les chaînes latérales de lysine sont les sites d'ubiquitination les plus courants, qui résultent d'une liaison amide ou iso-peptide entre l'Ubl et le substrat.

4.1 Activation et liaison des Ubls aux substrats

Les Ubls se lient aux substrats *via* une voie enzymatique (FIG. 18). L'ubiquitine et la plupart des Ubls sont synthétisées en tant que précurseurs inactifs. Elles ont besoin d'une modification afin d'exposer le groupement carboxyl de la glycine C-terminale,

TAB. XVI: Représentation de la famille des Ubls (Kerscher et al., 2006).

Famille d'Ubls	E1	E2	E3	Modification, Clivage par protéase	Fonction	Références
Ubiquitine	Uba1	Ubc1-8, -10, -11 Ubc13-Mms2	RING E3s HECT E3s	Oui, 6 classes de DUB : UBP, OTU/Cezanne, Ataxin-3/Josephin MPN+/JAMM et UL36USP	Dégradation du substrat, localisation du substrat, interactions entre protéines etc.	(Amerik et Hochstrasser, 2004) (Aguilar et Wendland, 2003)
Smt3/SUMO1-4	Uba-Aos1	Ubc9	Siz1, Siz2, Mms21	Oui (Ulp1, Ulp2)	Localisation du substrat, interactions entre protéines etc.	(Johnson, 2004)
Rub1/Nedd8	Uba3-Ula1	Ubc12	Dcn1 Dcn1	Oui, Yuh1, Cop9, signalosome	Activation et déstabilisation des complexes de SCF, régulation de la transcription de p53	(Xirodimas et al., 2004) (Wu et al., 2005)
ISG15	UbeL1	UbcH8	Herc5, Efp	Oui (Ubp43)	Peut être impliquée dans la transcription et l'épissage de l'ARN pré-messager pendant la réponse de l'IFN.	(Zhao et al., 2005) (Giannakopoulos et al., 2005)
Atg8	Atg7	Atg3	—	Oui, Atg4	Autophagie, recyclage nutritif chez les plantes	(Ohsumi, 2001) (Thompson et al., 2005)
Atg12	Atg7	Atg10	—	Non	Autophagie, recyclage nutritif chez les plantes	(Ohsumi, 2001) (Thompson et al., 2005)
UrmI	Uba4	—	—	Non	Bourgeonnement, <i>nutrient sensing</i> , Réponse au stress oxydatif	(Goehring et al., 2003) (Thompson et al., 2005)
UFM1	Uba5	Ufc1	—	Oui	Fonction inconnue	(Komatsu et al., 2004)
Fat10	—	—	—	Non	Dégradation du substrat indépendante de l'ubiquitine, induite par IFN- γ et TNF- α	(Hipp et al., 2005)
FUBI/MNSF β	—	—	—	Oui	Joue un rôle dans l'activation des cellules T ?	(Nakamura et Tanigawa, 2003)
Hub1	—	—	—	Non	Épissage de l'ARN pré-messager	(Wilkinson et al., 2004)

4.1. ACTIVATION ET LIAISON DES UBLs AUX SUBSTRATS

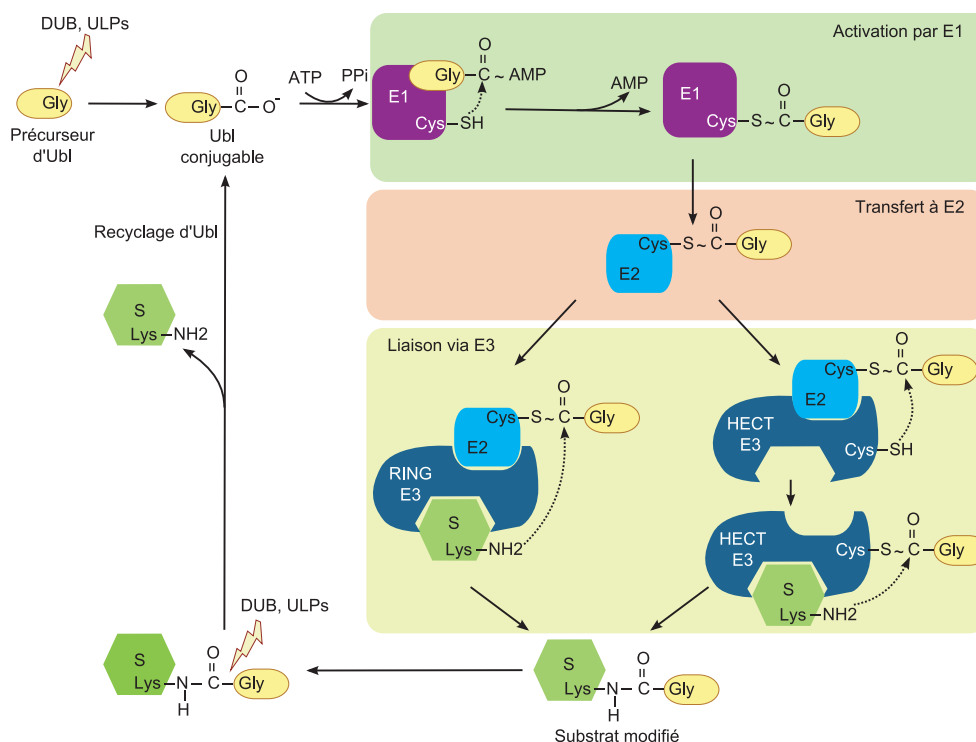


FIG. 18: **La voie de liaison d'Ubl au substrat** (Kerscher et al., 2006). Les précurseurs d'Ubls (y compris l'ubiquitine) sont modifiés par les DUBs (enzymes de déubiquitination) ou ULPs (Ubl-specific proteases) afin d'exposer leur résidu de glycine C-terminal. L'Ubl modifiée peut être activée avec l'ATP par E1 (*ubiquitin-activating enzyme*). Ensuite, l'Ubl est transférée à la cystéine catalytique de E2 (*ubiquitin conjugating enzyme*). Finalement le transfert de l'Ubl sur un résidu de lysine du substrat se fait directement à partir de E2 pour les E3 des familles RING ou nécessite la formation d'un troisième intermédiaire thiol-ester pour les E3 de la famille HECT. Les DUBs et les ULPs peuvent dissocier les Ubls de leurs substrats.

le site de liaison au substrat (Kerscher et al., 2006). Dans le cas de l'ubiquitine, les protéases spécifiques appelées les enzymes de déubiquitination (DUBs) sont responsables de cette modification, tandis que les *Ubl-specific proteases* (ULPs) modifient les autres Ubls.

L'ubiquitination des protéines fait intervenir trois types d'enzymes (Hershko et al., 2000). E1 (*ubiquitin-activating enzyme*) est unique et réagit avec l'Ubl en consommant de l'ATP pour générer un intermédiaire thiol-ester dans lequel le résidu C-terminal de l'Ubl est lié de façon covalente à un résidu cystéine du site actif de E1. Les enzymes E2 (*ubiquitin conjugating enzymes*), qui sont au nombre d'une trentaine chez les mammifères, transfèrent l'Ubl activée sur le substrat *via* un deuxième intermédiaire thiolester, soit directement avec l'aide d'une enzyme E3 de liaison (*Ub-ligase*), soit en passant par un troisième intermédiaire thiolester (Kerscher et al., 2006). La première

Ubl est transférée sur l' ϵ -NH₂ d'un résidu de lysine du substrat pour générer une liaison isopeptidique.

Bien que la lysine du substrat soit le site de liaison le plus fréquent pour l'ubiquitination, elle se fait parfois sur d'autres résidus. Dans certains cas, le groupement α -NH₂ libre du résidu N-terminal d'une protéine est le site d'ubiquitination (Ciechanover et Ben-Saadon, 2004). L'ubiquitine peut aussi être conjuguée au substrat *via* une chaîne latérale de cystéine, comme dans le cas de la chaîne lourde du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I qui est modifiée par une enzyme E3 virale appelée MIR-1 (Cadwell et Coscoy, 2005).

Il existe deux types principaux de E3 : RING (*Really Interesting New Gene*) et HECT (*Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus*). Les RING E3s se lient au E2-Ubl-thiolester et à la protéine-substrat en même temps, ce qui rapproche la lysine nucléophile du substrat au groupement réactif thiolester et facilite le transfert d'Ubl (Ozkan et al., 2005). Dans le cas de HECT E3, l'Ubl est transférée tout d'abord de E2 à un résidu cystéine dans le domaine conservé HECT de E3 puis l'Ubl se transporte au substrat (Ardley et Robinson, 2005).

Les E3 assurent l'essentiel de la spécificité de la réaction grâce à leur grande diversité (plusieurs centaines de E3 différentes dans une cellule eucaryote), bien qu'il existe une certaine redondance dans le système. Ainsi, une même protéine peut être reconnue par différentes E3 et une même E3 peut reconnaître différents substrats.

4.2 Polymères d'ubiquitine et Ubl

Une chaîne de poly Ubl peut être synthétisée par le transfert successif d'une Ubl activée sur un résidu de lysine de l'Ubl précédemment conjugué (Aguilar et Wendland, 2003). La chaîne la plus étudiée jusqu'à ce jour est celle de l'ubiquitine. L'ubiquitine possède sept résidus de lysine qui peuvent être potentiellement impliqués dans la formation de la chaîne polymérique. Cependant, parmi les résidus lysine, K₄₈ et K₆₃ sont les plus étudiés (Thrower et al., 2000). Les chaînes de polyubiquitine qui possèdent au moins quatre molécules d'ubiquitine liées par K₄₈, peuvent cibler effectivement un substrat conjugué au protéasome pour la dégradation protéique. La polymérisation des molécules d'ubiquitine par K₆₃, est impliquée dans les processus cellulaires tels que la réparation de l'ADN et la voie de transduction des signaux (Chan et Hill, 2001). La monoubiquitination est impliquée dans des processus différents tels que l'endocytose et la régulation de la transcription (Haglund et al., 2003).

Récemment, il a été démontré que les polymères d'ubiquitine pouvaient être formés sur les enzymes E2 et E3 avant d'être transférés au substrat, ce qui remet en question l'idée classique du montage séquentiel des monomères d'ubiquitine sur le résidu de lysine du substrat (Li et al., 2007).

4.2.1 Chaînes atypiques de l'ubiquitine

A part la forme classique de polyubiquitine (K_{48}), les autres polymères sont caractérisés en tant que chaînes atypiques (Ikeda et Dikic, 2008). La FIG. 19 représente différentes classes de chaînes atypiques.

Les chaînes homotypiques sont constituées de la polymérisation de molécules d'ubiquitine par liaison sur un seul type de lysine tandis que les chaînes *mixed-linkage* résultent de la liaison de molécules d'ubiquitine via différentes lysines divergentes. Par conséquent, les chaînes d'ubiquitine *mixed-linkage* présentent des bifurcations comme dans le cas des chaînes comprenant deux types différents de liaison : $K_{6/11}$, $K_{27/29}$, $K_{29/48}$ ou $K_{29/33}$ (Kim et al., 2007).

L'intégration d'autres Ubls comme SUMO et NEDD8 dans les chaînes d'ubiquitine, conduit à des chaînes hétérologues qui sont moins étudiées (Kim et al., 2007). Les E3s jouent un rôle important dans la sélection de substrats et le contrôle de la formation de chaînes d'ubiquitine sur le substrat. À titre d'exemple, le E6AP (une HECT E3) peut former une chaîne de

polyubiquitine (K_{48}) (Scheffner et Whitaker, 2003), tandis que KIAA10 (une HECT E3) catalyse les chaînes de polyubiquitine (K_{48} et K_{29}) (Wang et al., 2006). Un autre exemple, concerne le cas de la CBL ligase (une RING E3) qui catalyse la monoubiquitination multiple (K_{11} , K_{48} et K_{63}) du récepteur activé du facteur de croissance épidermique (EGFR) par un mécanisme d'oligo-ubiquitination (Huang et al., 2006).

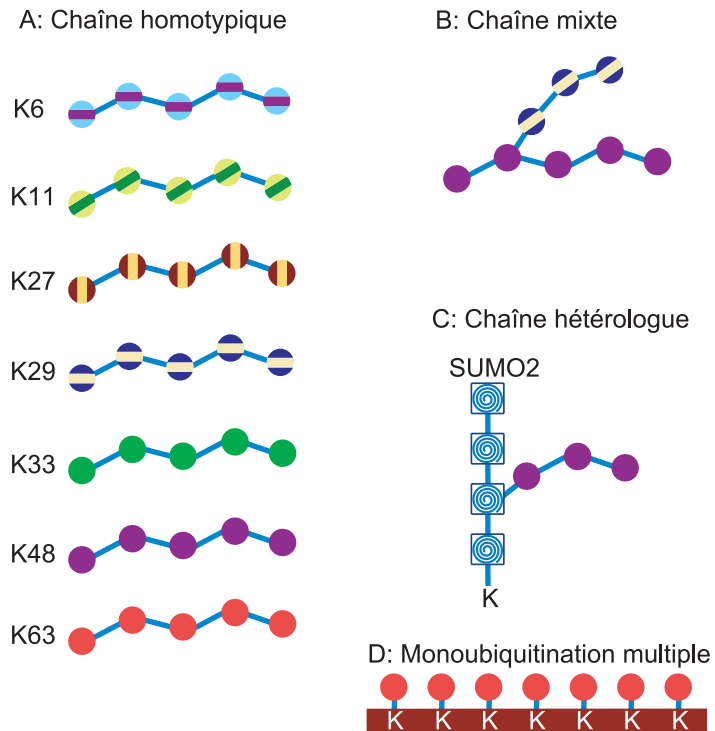


FIG. 19: Représentation schématique des modèles possibles de formation de chaînes d'ubiquitine sur la protéine cible. (Ikeda et Dikic, 2008). **A** : les chaînes typiques et atypiques homotypiques. **B** : les chaînes atypiques à liaison mixte (*mixed-linkage*) sont formées en utilisant différents résidus lysine, ce qui génère les chaînes branchées. **C** : les chaînes hétérologues sont formées entre l'ubiquitine et les protéines *ubiquitin-like* comme SUMO2. **D** : la monoubiquitination multiple concerne l'ubiquitination du substrat sur différents résidus de lysine.

Caractérisation des chaînes atypiques d'ubiquitine

Bien que tous les résidus lysine d'ubiquitine soient impliqués *in vivo* dans la formation de la chaîne d'ubiquitine, leur importance biologique n'est pas bien caractérisée. La discrimination entre les chaînes atypiques d'ubiquitine qui produisent un signal physiologique valide et celles qui, formées au cours de l'ubiquitination, n'ont aucun rôle biologique spécifique, constitue un problème important à résoudre.

La chaîne atypique d'ubiquitine (K₆₃) joue un rôle important dans la transduction du signal via NF- κ B. En plus, elle est impliquée dans l'endocytose du récepteur et la réparation de l'ADN (Haglund et Dikic, 2005; Hayden et Ghosh, 2008).

Il a été récemment démontré que les chaînes *mixed-linkage* d'ubiquitine (K₂₉/K₃₃) sont impliquées dans le contrôle des AMPK (*AMP-activated protein kinase*)-*related kinases*. Ce sont les kinases qui contrôlent la polarité et la prolifération cellulaire. La polyubiquitination par les chaînes d'ubiquitine (K₂₉/K₃₃), bloque l'activité de kinase (Al-Hakim et al., 2008).

4.2.2 Reconnaissance de chaînes d'ubiquitine par les domaines de substrat se liant à l'ubiquitine

Les domaines protéiques se liant à l'ubiquitine (UBDs) fixent la monoubiquitine et les chaînes de polyubiquitine. Plus de vingt familles d'UBD sont déjà identifiées (Hurley et al., 2006; Ikeda et Dikic, 2008). L'affinité de la liaison *in vitro* entre les UBDs et l'ubiquitine est évaluée normalement à $K_d = 10\text{--}500 \mu\text{M}$, ce qui est relativement faible pour une interaction physiologique. D'autre part, la concentration intracellulaire d'ubiquitine libre est assez élevée, soit $10\text{--}20 \mu\text{M}$ dans différentes cellules en culture (Haas et Bright, 1985) ce qui pose la question de savoir comment les UBDs différencient l'ubiquitine libre de sa forme conjuguée. Il a été suggéré que l'interaction physiologique entre les UBDs et l'ubiquitine est conduite par l'affinité cumulative des liaisons, ce qui est contrôlé par les interactions multivalentes entre les substrats ubiquitinés et les protéines liant l'ubiquitine (Ikeda et Dikic, 2008).

Comment différents enchaînements des molécules d'ubiquitine peuvent provoquer différentes conséquences physiologiques? Certains UBDs se lient aux différentes chaînes d'ubiquitine (en fonction du résidu lysine impliquée dans le polymère d'ubiquitine) d'une manière spécifique et préférentielle. En effet, les chaînes d'ubiquitine possèdent différentes conformations qui présentent des surfaces spécifiques pour les interactions avec UBDs. À titre d'exemple, la polyubiquitine (K₄₈) adopte une conformation compacte, tandis que la di-ubiquitine (K₆₃) possède une forme étendue (*extended*) ou linéaire (Varadan et al., 2002, 2004).

Certaines protéines possédant des UBDs sont auto-ubiquitinées par un mécanisme

incomplètement décrypté (Hurley et al., 2006). À titre d'exemple, les UIMs (*ubiquitin-interacting motif*, une classe des UBDs) sont capables de jouer le rôle de l'ubiquitine ligase (en forme *cis*) pour l'auto-ubiquitination de protéines qui possèdent ces motifs. La fonction biologique d'auto-ubiquitination est actuellement le sujet de plusieurs études. Une hypothèse avancée propose qu'il s'agit d'une interaction intramoléculaire entre l'UBD et l'ubiquitine liée à l'autre région de la même protéine. Par cette interaction intramoléculaire, l'UBD peut devenir non fonctionnelle (Hoeller et al., 2007) pour les liaisons intermoléculaires (FIG. 20).

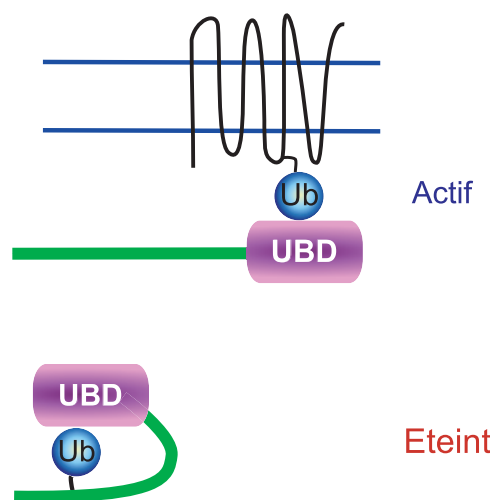


FIG. 20: Régulation des protéines contenant UBD (domaine se liant à l'ubiquitine) par auto-ubiquitination (Hurley et al., 2006).

4.3 Dégradation des substrats polyubiquitinés par le protéasome

4.3.1 Le protéasome 26S

Le protéasome 26S est un complexe protéique d'environ 2,4 MDa constitué de deux sous-complexes : le sous-complexe 20S et le sous-complexe 19S (Pickart et Cohen, 2004).

Le sous-complexe 20S est un complexe de 700 kDa en forme de cylindre creux. Chez les eucaryotes, il est constitué de deux copies de 14 sous-unités différentes ($\alpha 1$ – $\alpha 7$ et $\beta 1$ – $\beta 7$) dont trois ($\beta 1$, $\beta 2$ et $\beta 5$) possèdent un site actif de protéase à thréonine situé vers le lumen central (Demartino et Gillette, 2007). Les substrats se mettent dans cette chambre protéolytique *via* les pores de 13 Å formés par les anneaux des sous-unités α à chaque extrémité du cylindre.

Le sous-complexe 19S (appelée aussi PA700) est un complexe de 1 MDa constitué de 20 sous-unités qui peuvent s'associer à l'une ou aux deux extrémités du cylindre 20S (Demartino et Gillette, 2007). Il intervient à différents niveaux dans la régulation de l'activité du protéasome : il sélectionne les substrats, les prépare pour la dégradation,

ce qui permet leur translocation dans le cylindre 20S.

4.3.2 Reconnaissance des substrats ubiquitinés par le protéasome

Pour être reconnu par le protéasome, le substrat doit être lié à une chaîne d'au moins quatre molécules d'ubiquitine, reliées entre elles par des liaisons isopeptidiques entre le résidu de G₇₆ d'une ubiquitine et le résidu de K₄₈ de l'ubiquitine précédente (Thrower et al., 2000). La plupart des protéines ubiquitinées sont adressées au protéasome grâce à des protéines navettes se liant d'un côté à des chaînes d'ubiquitine et, de l'autre, au complexe régulateur 19S (Farràs et al., 2005). La structure quaternaire des polymères d'ubiquitine et la disposition dans l'espace de chaque molécule d'ubiquitine sont des facteurs importants pour la capacité des chaînes de polyubiquitine à diriger les substrats vers une dégradation par le protéasome.

4.4 Ubiquitine et endocytose

L'implication de l'ubiquitine dans le processus d'endocytose (FIG. 21) a été démontrée pour la première fois dans la levure (Hicke et Riezman, 1996; Kölling et Hollenberg, 1994). Il a été établi que la mono-ubiquitination constitue un signal pour l'internalisation (Terrell et al., 1998) et que la chaîne de polyubiquitine (K₆₃) facilite l'endocytose (Galan et Haguenaer-Tsapis, 1997). Par la suite, d'autres travaux ont montré que dans la levure, l'internalisation de plusieurs protéines membranaires est liée à l'ubiquitination (Hicke et Dunn, 2003). Les enzymes régulatrices de la voie d'ubiquitination et les ubiquitine ligases (E3) contrôlent la spécificité et la cinétique de la dégradation des protéines membranaires, par la mono ubiquitination de ces dernières. Les liaisons à l'ubiquitine (mono) sont reconnues par les protéines impliquées dans le mécanisme d'endocytose qui possèdent les motifs UBDs (domaines protéiques se liant à l'ubiquitine) tels que UBA (*ubiquitin-associated domains*), UEV (*ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant*) et UIM (*ubiquitin-interacting motif*) (Hicke et Dunn, 2003; Hurley et al., 2006).

Dans les cellules animales, la situation est moins claire. Il a été démontré que la voie d'ubiquitination est impliquée dans l'internalisation du récepteur de l'hormone de croissance, mais l'ubiquitination du récepteur lui-même n'est pas nécessaire (Strous et al., 2004). Il a été démontré que dans les cellule HeLa, l'activation du récepteur du facteur de croissance épidermique (REGF) par une concentration élevée de l'EGF provoque la mono-ubiquitination et l'internalisation de ce récepteur de manière indépendante de la clathrine (Sigismund et al., 2005). Ainsi, dans les cellules animales une seule molécule d'ubiquitine peut jouer le rôle du signal d'internalisation (Mukhopadhyay et Riezman, 2007).

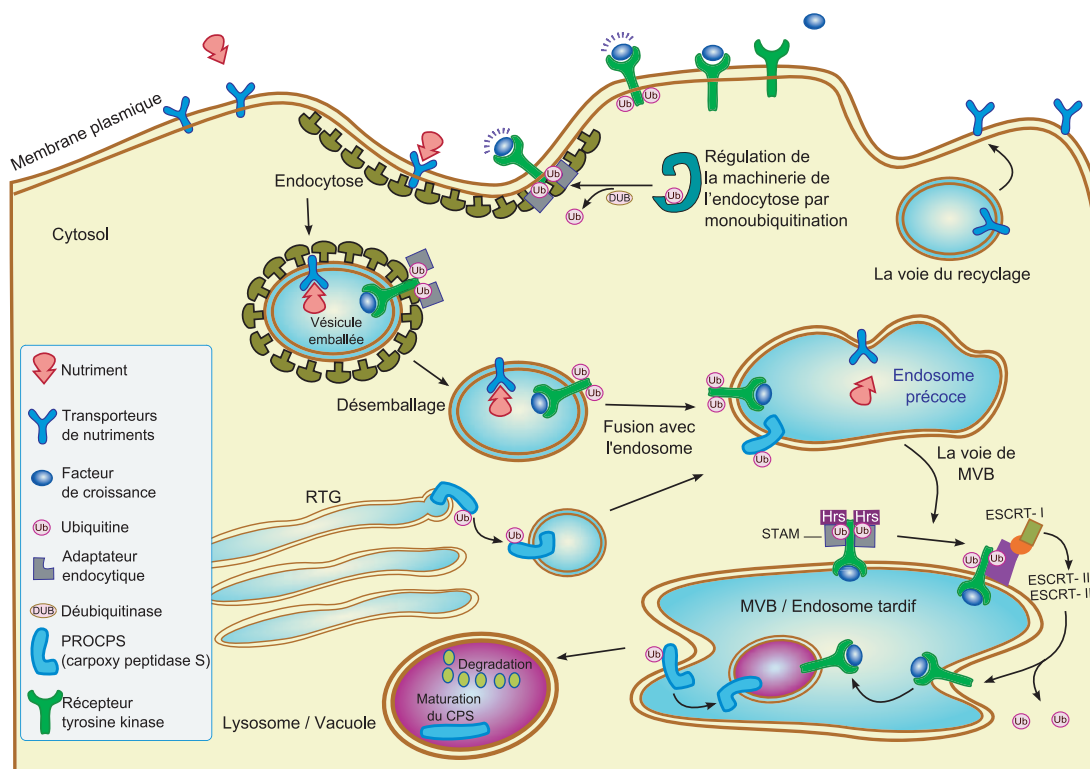


FIG. 21: L'ubiquitine est impliquée dans la voie de l'endocytose. Les domaines cytoplasmiques de plusieurs protéines et récepteurs membranaires sont ubiquitinés. En tant que signal, l'ubiquitine est impliquée dans la voie du MVB (corps multivésiculaire) où elle est reconnue par Vps27/Hrs et transférée au complexe ESCRT (*endosomal sorting complex required for transport*). L'ubiquitine est clivée avant l'entrée dans les vésicules internes du MVB. Les protéines non ubiquitinées, telles que les transporteurs de nutriments, sont recyclées depuis les endosomes vers la surface cellulaire (Mukhopadhyay et Riezman, 2007).

La polyubiquitination est impliquée dans l'endocytose de protéines membranaires. À titre d'exemple, la stimulation du récepteur β_2 -adrénergique (β_2 AR) par son agoniste, provoque la polyubiquitination rapide de ce récepteur et de sa protéine régulatrice la β -arrestine. Vraisemblablement, c'est la polyubiquitination de la β -arrestine qui est nécessaire pour l'internalisation du β_2 AR (Shenoy et al., 2001). De la même manière, la polyubiquitination (K_{63}) du récepteur tyrosine kinase A (TrkA), le récepteur du facteur de croissance des nerfs (NGF), est nécessaire pour l'internalisation et la signalisation du TrkA (Geetha et al., 2005).

La conformation linéaire des chaînes de polyubiquitine (K_{63}) offre une topologie qui expose les surfaces hydrophobes des ubiquitines pour une liaison de forte affinité avec les UBDs conduisant à l'internalisation de la protéine ubiquitinée (Varadan et al., 2004). Pour les récepteurs qui ne possèdent pas un grand nombre de résidus de lysine

pouvant être ubiquitinés, la polyubiquitination (K_{63}) est un mécanisme alternatif qui apporte assez d'affinité pour la liaison avec les UBDs (Mukhopadhyay et Riezman, 2007). En tant que signal d'adressage (*sorting signal*), l'ubiquitination est impliquée dans le transport des protéines membranaires vers l'intérieur de l'endosome tardif (ou corps multivésiculaire MVB) qui est la première étape de transport vers le lysosome (Komada et Kitamura, 2005; Hurley et al., 2006).

4.5 Ubiquitine et autres rôles biologiques

En plus de ces rôles dans la dégradation protéique et l'endocytose, l'ubiquitination est impliquée dans la réplication et la transcription de l'ADN. Le PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), une protéine connue pour améliorer l'activité des ADN polymérases chez les eucaryotes et les *Archæa* lors de la réplication de l'ADN, présente deux types d'ubiquitination qui influencent le recrutement des ADN polymérases (Mukhopadhyay et Riezman, 2007).

L'ubiquitination est un régulateur majeur de la voie de signalisation du NF- κ B, un facteur de transcription dimérique. Le NF- κ B est séquestré dans le cytoplasme sous une forme inactive par son inhibiteur I κ B α (Sun et al., 2004). I κ B α subit la phosphorylation par la kinase de I κ B α (IKK) qui possède une sous-unité régulatrice appelée NEMO (NF- κ B essential modulator). La polyubiquitination (K_{63}) du NEMO par TRAF6 (*TNF- α receptor associated factor 6*), une ubiquitine ligase de type *RING-finger*, active IKK. La phosphorylation du I κ B α par IKK activée, permet la polyubiquitination (K_{48}) et la dégradation du I κ B α , ce qui libère le NF- κ B pour être transporté dans le noyau (FIG. 22) (Zhou et al., 2004). La IKK peut être activée aussi par la kinase TAK1 (TGF- β activated kinase). Les protéines adaptatrices de TAK1, TAB1 (*TAK1-binding protein 1*), TAB2 et TAB3 se lient à la chaîne de polyubiquitine (K_{63}) et TAK1 provoque l'activité kinase de ce dernier (Kanayama et al., 2004).

L'ubiquitination joue un rôle important dans la sécrétion d'insuline (Kawaguchi et al., 2006). Il a été démontré que dans les cellules MIN6-m9 (une lignée cellulaire des cellules pancréatiques bêta de souris), la sous-unité α des canaux calciques voltage-dépendants (VDCC) subit le processus d'ubiquitination suivi de l'augmentation de son expression au niveau de la membrane plasmique (Kawaguchi et al., 2006). En plus, le traitement par l'inhibiteur du protéasome diminue fortement l'activité de VDCC, montrant l'importance du système d'ubiquitination pour le fonctionnement normal de VDCC.

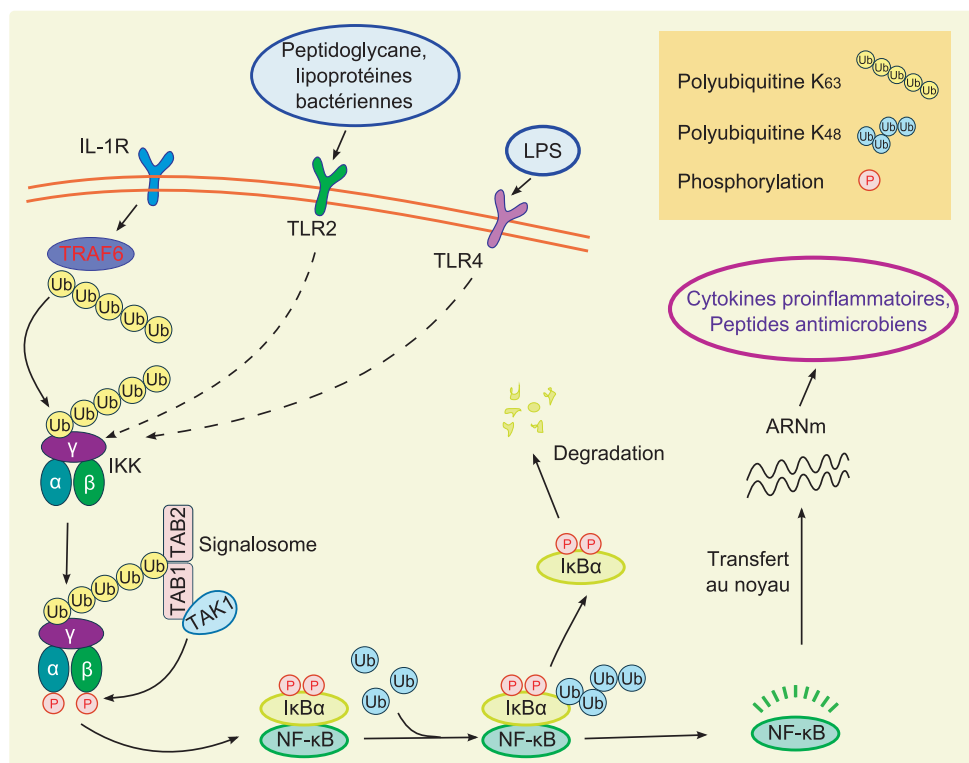


FIG. 22: L'ubiquitination est un régulateur majeur de la voie de signalisation du NF- κ B. L'activation du récepteur d'IL-1 (IL-1R), provoque la polyubiquitination (K₆₃) du IKK γ (NEMO) *via* TRAF6. Le complexe TAB/TAK1 se lie à IKK ubiquitiné, formant le signalosome qui induit la phosphorylation du IKK. L'IKK phosphorylé provoque à son tour la phosphorylation du I κ B α suivie par la polyubiquitination (K₄₈). Suite à la libération du NF- κ B par la dégradation du I κ B α , le NF- κ B se transporte au noyau et induit la transcription (Mukhopadhyay et Riezman, 2007).

4.6 Ubiquitine et pathologies

L'ubiquitine intervient dans de nombreux processus cellulaires parmi lesquels figurent la transcription (Liu, 2004), la réparation de l'ADN (Ulrich, 2005), la différenciation cellulaire (Coulombe et al., 2003) et la régulation de l'apoptose (Schile et al., 2008).

4.6.1 Cancer

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle universelle dans la régulation des processus cellulaires. Ainsi, le dysfonctionnement du système d'ubiquitination aboutit au développement de tumeurs malignes et le cancer. La dégradation élevée des protéines suppresseurs de tumeur par le protéasome ou l'abrogation forte de

la dégradation des protéines oncogènes sont impliquées dans l'oncogenèse de plusieurs cancers (Mukhopadhyay et Riezman, 2007).

4.6.2 Infection

Plusieurs pathogènes et virus ont développé des mécanismes pour perturber le système d'ubiquitination afin d'assurer leur survie. À titre d'exemple, la toxine d'anthrax cible l'ubiquitination de son récepteur, afin de faciliter l'endocytose efficace et rapide du complexe toxine-récepteur. Cette endocytose est importante pour l'activité de la toxine car le pH acide des compartiments endosomaux, augmente son activité et sa toxicité (Abrami et al., 2006).

Yersinia produit un facteur de virulence, YopJ, qui agit comme une enzyme de déubiquitination, en empêchant l'activation de NF- κ B (Zhou et al., 2005). Par ailleurs, plusieurs virus expriment des enzymes E3 (*ubiquitine ligase*) afin d'éliminer les protéines du système immunitaire. Le 8^{ème} virus humain de l'herpès (HHV-8), le *Kaposi sarcoma-associated herpes virus* (KSHV) expriment MIR-1 (*modulator of immune recognition-1*) (une ligase, E3) qui provoque l'ubiquitination des résidus C du CMH I (complexe majeur d'histocompatibilité de classe I) (Cadwell et Coscoy, 2005). Cette forme d'ubiquitination est suffisante pour l'endocytose et la dégradation de molécules du CMH I.

4.6.3 Maladies neurodégénératives

Le défaut d'ubiquitination est impliqué dans plusieurs maladies neurodégénératives, telles que la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer et la maladie de Huntington. L'accumulation des agrégats protéiques insolubles et riches en ubiquitine, ainsi que d'autres composantes du système d'ubiquitination et du protéasome, a été démontrée dans plusieurs maladies neurodégénératives (Mukhopadhyay et Riezman, 2007). La protéine Parkin, est une enzyme E3 de type *RING-finger* qui est impliquée dans la forme familiale de la maladie de Parkinson (Fallon et al., 2006). Parkin possède un domaine Ubl (*ubiquitin-like*) qui interagit avec UBD de Eps15. Cette interaction inhibe l'endocytose et la *down-regulation* de EGFR (Fallon et al., 2006), induisant un effet sur le développement de la maladie. Parkin est aussi capable de synthétiser les chaînes de polyubiquitine (K₆₃) sur les protéines telles que la *synphilin-1* et sur les protéines modifiées localisées dans les *Lewy-like inclusion bodies* (Lim et al., 2005).

4.7 Rôles de l'ubiquitine dans l'immunité

La contribution de l'ubiquitine au fonctionnement du système immunitaire est connue depuis longtemps. En effet, elle a été identifiée au départ en tant qu'un fac-

teur promoteur de la différenciation des lymphocytes (Goldstein et al., 1975). Depuis, différentes études ont démontré l'implication de l'ubiquitination des protéines dans les mécanismes immunitaires tels que le contrôle de la tolérance immunitaire, la différenciation des lymphocytes T et la transduction intracellulaire du signal induit par l'antigène, les cytokines ou les ligands de récepteurs *Toll like* ou *TLRs* (Liu et al., 2005).

4.7.1 Réponse immunitaire innée

L'ubiquitination (FIG. 21) est un processus clé dans la régulation de la voie de signalisation des TLRs, présenté dans la partie précédente (Kawai et Akira, 2007). L'activation des TLRs par les éléments microbiens (tels que le LPS), déclenche la voie de signalisation, résultant de l'activation du NF- κ B, ce qui provoque par la suite la transcription et l'expression des gènes des cytokines proinflammatoires et des précurseurs des PAMs.

En tant que PAM, l'ubiquitine joue un rôle direct dans la réponse immunitaire innée. Le fragment C-terminal UB₆₅₋₇₆ possède une puissante activité antifongique agissant en synergie avec le fragment N-terminal UB₁₋₃₄ (qui pourraient être générés suite à une infection par *S. aureus* (Kieffer et al., 2003). Stockée dans les granules de sécrétion des cellules chromaffines, l'ubiquitine est libérée dans la circulation, lors d'un stress, avec les catécholamines et des PAMs dérivés des chromogranines et de la proenképhaline A. Par ailleurs, l'ubiquitine est caractérisée dans le *vernix caseosa* (une substance cireuse d'origine sébacée, blanchâtre et grasse recouvrant et protégeant la peau des nouveau-nés) en accompagnement des autres PAMs tels que défensine et cathélicidine (Yoshio et al., 2003).

La forme ubiquitinée de certains PAMs est aussi caractérisée. Dans une étude sur les neutrophiles humains stimulés par G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*), parmi plusieurs PAMs caractérisés, l'histone H1A est retrouvée sous une forme ubiquitinée possédant encore l'activité antimicrobienne comme sa forme libre (Wang et al., 2002).

4.7.2 Réponse immunitaire adaptative

Le protéasome joue un rôle important dans l'initiation des réponses immunitaires adaptatives en générant des peptides bactériens pour les charger sur les molécules du CMH de classe I (Veiga et Cossart, 2005). Ainsi, l'ubiquitination a été proposée comme étant impliquée dans l'élimination des bactéries pathogènes dans le cytosol des cellules de mammifères (Perrin et al., 2004). Il a été démontré que dans les macrophages infectés par *Salmonella typhimurium* (un pathogène intracellulaire), les bactéries sont entourées dans le cytosol par les molécules d'ubiquitine et le protéasome, ce qui suggère l'implication du protéasome dans l'induction de la réponse immunitaire contre *Salmonella* (Veiga

4 Découverte de l'ubiquitine et des protéines apparentées

et Cossart, 2005). Récemment, il a été démontré que SseL, une enzyme DUB de *Salmonella*, est essentielle pour sa virulence et sa survie dans les macrophages (Rytkönen et al., 2007).

Matériels et Méthodes

5 Matériels et méthodes

5.1 Préparation du matériel biologique

Notre modèle d'étude biologique est la cellule chromaffine, cellule sécrétrice de la médullo-surrénale de bœuf. Les protéines étudiées sont les chromogranines/sécrétogranines (chromogranine A, B) et l'ubiquitine.

5.1.1 Isolement 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, immédiatement 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 saccharose. Nous avons utilisé le protocole modifié et adapté aux glandes surrénales par D. Aunis (Aunis et al., 1977), basé sur le procédé d'extraction initialement décrit par A.D. Smith et H. Winkler (Smith et Winkler, 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 les 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 saccharose 0,32 M, Hepes 10 mM 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 et homogénéisé par une Potterisation manuelle.

Par une nouvelle centrifugation à 100 000 g sur gradient de sucrose (1,6 M saccharose, 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. Ce dernier est repris dans le tampon Hepes 10mM pH 7.5, Triton X-100 1 %) pour l'extraction des protéines membranaires.

5.1.2 Dosage protéique

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

La quantité de protéine 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 nos 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.

5.2 Synthèse peptidique

5.2.1 Peptides synthétiques non modifiés

Tous les peptides synthétiques présentés dans cette thèse ont été préparés par Bernard Guérol, (Ingénieur de Recherche ; Inserm U575) à l'aide d'un synthétiseur Applied Biosystems 432A SYNERGY (Foster City, USA) 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) en utilisant un gradient d'acétonitrile. Après lyophilisation, la pureté des

peptides synthétiques est de nouveau contrôlée par spectrométrie de masse MALDI-TOF et séquençage protéique.

5.2.2 Peptides synthétiques rhodaminés

Dans le cadre des analyses par la vidéo microscopie, il a été nécessaire 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 NH_2 -terminal du peptide synthétique, par incorporation en fin de synthèse de la même manière qu'un acide aminé.

5.2.3 Peptides synthétiques avec un pont disulfure

Pour synthétiser le peptide $\text{CGA}_{14-20/38-40}$ ($\text{V}_{14}\text{MKCIVE}_{20} - \text{C}_{38}\text{FE}_{40}$) possédant un pont disulfure, d'abord la séquence (CFEVMKCIVE) a été synthétisée par la méthode classique Fmoc. Le pont disulfure a été généré en ajoutant quelques gouttes de NH_4OH (30 %) au peptide (0.5 mg/ml H_2O) jusqu'à pH9. Après 4 jours sous agitation, le milieu a été neutralisé par CH_3COOH . Finalement 6 mg de peptide avec pont disulfure a été traité avec 250 μg de l'endoprotéase Gluc-C de *Staphylococcus aureus* V8 dans le tampon Tris 50 mM pH 8 pendant 19h à 37°C (Volume final 12ml), afin de couper la liaison après le résidu E. Les peptides obtenus ont été purifiés par HPLC en phase inverse.

5.2.4 Peptide branché

Le peptide branché est constitué de deux peptides : l'ubifungine (ubiquitine₆₅₋₇₆ : STLHLVLRRLRGG) branchée sur la lysine de la chromofungine (bCGA₄₇₋₆₆ : RILSILRHQNLLKELQDLAL) par la liaison isopeptidique. La chromofungine a été synthétisée en utilisant le résidu K couplée au Fmoc-Lys(Dde)-OH permettant la déprotection sélective (manuelle). Le groupement Dde du résidu K est enlevé par le traitement avec monohydrate hydrazine 2 % dans DMF pendant 15 min suivie d'un lavage avec DMF. Cette étape est répétée trois fois, et la déprotection de K est vérifiée par le test de Kaiser. Après la déprotection de N ϵ -lysine de la chromofungine synthétisée, la synthèse de l'ubifungine est réalisée sur ceci par la méthode classique du Fmoc.

5.3 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 sera retenu au niveau de la phase stationnaire par les interactions hydrophobes de ces chaînes carbonées.

5.3.1 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, on peut réduire celle-ci par dialyse. Les purifications préliminaires doivent se faire de préférence avec des solutions volatiles qui seront éliminées lors de la concentration de l'échantillon au Speed-Vac. Les échantillons seront concentrés jusqu'à un volume minimum de 20 µl en évitant de sécher complètement l'échantillon. Le choix de tubes Minisorb traités (Nunc, Danemark) pour éviter l'absorption des protéines sur le support a été retenu.

5.3.2 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 %

Les produits chimiques utilisés pour l'élution sont *HPLC-grade*. Nous utilisons des solvants spécialement prévus pour cette application et fournis par Carlo Erba.

5.3.3 Séparation

Le système HPLC que nous avons utilisé est un *DIONEX ASI-100*, 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 Å. 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.

5.4 Chromatographie d’affinité

Nous avons utilisé la chromatographie d’affinité pour pouvoir récupérer plus spécifiquement et en quantité suffisante les protéines ubiquitinées présentes au niveau de la membrane du granule chromaffine (PMG).

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, que l’on appelle le ligand, ces deux molécules interagissant de manière hautement spécifique. Sur des colonnes HiTrap (comprenant une matrice de sépharose) activée au NHS (N-hydroxysuccinimide, Amersham Bioscience) des anticorps spécifiques clone FK2 (contre les protéines ubiquitinées) sont fixés.

5.4.1 Fixation des anticorps sur la colonne d’affinité

Le ligand (anti FK2) est dissout dans un tampon de couplage (0,5 M NaCl ; 0,2 M NaHCO₃, pH 8,3) jusqu’à une concentration de 5 mg/ml dans un volume optimal de 1 ml. La colonne est lavée avec 3 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 3 volumes d’une solution 0,5 M NaCl ; 0,5 M éthanolamine, pH 8,3 alterné avec des lavages de 3 volumes d’une solution 0,5 M NaCl ; 0,1 M acétate, pH4. Puis la colonne est neutralisée par ajout de tampon 0,05 M Na₂HPO₄, pH 7.

5.4.2 Purification de l’échantillon

La colonne est équilibrée par 10 volumes de colonne de tampon 75 mM Tris-HCl pH 8 (Tampon A). Puis 1 ml d’échantillon (1 mg de PMG) dissout dans le tampon A est déposé sur la colonne. Les protéines non fixées de l’échantillon sont éluées par 10 volumes de colonne de tampon A. La protéine d’intérêt est éluée par 3 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 10 volumes de tampon A. L’échantillon peut être dessalé avant analyse.

5.4.3 Dessalage des échantillons

Après la chromatographie d'affinité, il est indispensable d'éliminer les sels au cours d'une électrophorèse, qui constitue la première étape de l'analyse protéomique. Cette étape de dessalage a été effectuée la dialyse en utilisant 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.

On remarquera que la chromatographie HPLC peut également être utilisée comme technique de dessalage en utilisant une élution isocratique par l'éluant A.

5.5 Électrophorèse 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 μ l par séchage au 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 3 volumes d'échantillon pour 1 volume de tampon, puis portés à ébullition pendant 3 min. Pour chaque expérience, 20 μ g de PSG (Protéines Solubles des Granules chromaffines de la médullosurrénale bovine) sont déposées sur le gel afin de contrôler le bon déroulement de l'électrophorèse et de l'immunodétection. Par ailleurs, les MM (masses moléculaires) sont visualisés par des bandes colorées, correspondant à des protéines standard (Invitrogen, Sigma ou Bio-Rad) de poids moléculaire compris dans la gamme. Les échantillons protéiques 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 (pour obtenir de zones protéiques très fines dans le gel de concentration, qui migreront dans le gel de séparation) 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 Tris-HCl pH 8,2 (Towbin et al., 1979). En cas d'utilisation des gel précoulés (4–12 %, Criterion XT, BIO-RAD, USA) avec le tampon de migration XT MOPS (BIO-RAD, USA), un champ électrique de 200 V a été appliqué.

5.5.1 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 4 h à une nuit sous agitation. Les protéines restent colorées et leur migration électrophorétique correspond à leur poids moléculaire apparent par référence avec la migration des protéines standards utilisées.

5.5.2 Electrotransfert et immunodétection

Afin de réaliser des immunodétections des protéines d'intérêt (Western Blot), nous réalisons en premier lieu des électrotransferts sur membrane de PVDF. Le transfert des protéines d'un gel de polyacrylamide sur une membrane de PVDF d'une porosité de 0,45 μm (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 al., 1979).

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 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, se fait grâce à une développeuse (Hyperprocessor, Amersham pharmacia biotech).

Les différents anticorps utilisés pour les analyses par Western blot, ainsi que leurs dilutions respectives, sont récapitulés dans le TAB. XVII :

TAB. XVII: Conditions d'utilisation des anticorps lors des western blot.

Anticorps primaire	Dilution	Anticorps secondaire	Dilution
Anti CGA monoclonal	1/3000	Ac anti-IgG de souris couplé HRP	1/400.000
Anti Ubiquitine monoclonal	1/1000	Ac anti-IgG de souris couplé HRP	1/400.000
Anti protéines ubiquitinées (FK2) monoclonal	1/4000	Ac anti-IgG de souris couplé HRP	1/400.000
Anti <i>ubiquitin-activating enzymes</i> (E1A/B) polyclonal	1/2000	Ac anti-IgG de souris couplé HRP	1/400.000

5.6 Analyses protéomiques

5.6.1 Séquençage peptidique

Lorsque l'on cherche à connaître la séquence N-terminale de peptides ou protéines purifiées on utilise un séquenceur automatique d'Edman (Applied Biosystem 473 A) (Metz-Boutigue et al., 1993). 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.

5.6.2 Spectrométrie de masse MALDI-TOF

La technique de spectrométrie de masse MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation Time-Of-Flight*) a été utilisée afin de déterminer la masse moléculaire des différents échantillons. Les mesures ont été effectuées sur un spectromètre de masse Bruker (MALDI-TOF), de type BIFLEXTM, 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 a été fait selon la technique dite de *sandwich* décrite par Kussman et al. (Kussmann et al., 1997). Sur la cible on dépose tout d'abord 5 μl d'une

solution contenant une matrice, constituée d'une solution saturée d'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique (Sigma) à 7 mg/ml dissoute dans de l'acétone. Après séchage 5 μ l d'une solution d'eau/TFA (acide Trifluoroacétique) 0,1% (v/v) sont placés sur le premier dépôt puis est ajouté directement 5 μ l de l'échantillon à tester. Le dépôt entier est recouvert ensuite par 5 μ l d'une solution saturée d'acide alpha-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 50 ppm. 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 ; 5734 Da ; 12361 Da ; 16952 Da ; 39212 Da ; 66430 Da).

5.7 Caractérisation des protéines ubiquitinées par nano LC/MS/MS

Les analyses nano LC/MS/MS ont été réalisées au laboratoire de spectrophotométrie de masse bioorganique (CHRS, UMR 7512) par François Delalande (Ingénieur de Recherche, Inserm U575).

La digestion du matériel protéique immobilisé dans le gel est réalisée en utilisant le système automatique de la digestion de protéine, MassPREP Station (Waters, Millford, USA). Les languettes de gels sont lavées trois fois avec le tampon 25 mM NH_4HCO_3 : CH_3CN (1 :1, v/v). Les résidus cystéines des protéines sont réduits en ajoutant 50 μ l de DTT 10 mM à 57°C puis l'alkylés avec l'iodoacetamide 55 mM (50 μ l). Après la déshydratation de gel par l'acétonitrile, les protéines sont protéolysées dans le gel en ajoutant 40 μ l de trypsine 12,5 ng/ μ l (Promega) dans NH_4HCO_3 25 mM à 37°C pendant 4h. L'extraction des peptides tryptiques est faite en utilisant 60 % d'acétonitrile dans 5 % (v/v) d'acide formique, suivie d'une deuxième extraction par l'acétonitrile.

Les peptides sont analysés par nanoLC-MS/MS, en utilisant le système Agilent 1100 Series HPLC-Chip/MS (Agilent, Santa Clara, USA) couplé au système HCT Ultra ion trap (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Pour les analyses de tandem MS, le système est basculé automatiquement entre le mode MS et MS/MS. Dans chaque spectre de MS, les trois peptides plus abondants sont choisis pour les prochaines étapes de séparation et fragmentation.

Les données obtenues des analyses de nanoLC-MS/MS sont traitées pour la recherche dans le serveur local de Mascot (version MASCOT 2.2.0, MatrixScience) utilisant la base de données de protéines sur le site de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). La lysine ubiquitinée est caractérisée par une mass de 114 Da de plus qui correspond aux deux résidus G situés à l'extrémité C-terminale de l'ubiquitine.

5.8 Caractérisation des activités biologiques

5.8.1 Activité bactérienne

Le test antibactérien est réalisé en milieu liquide suivant les conditions expérimentales mises au point dans le laboratoire du Pr. J. Hoffmann (CNRS UPR 9022, Immunité des Insectes, Strasbourg) (Bulet et al., 1993). Les souches de bactéries testées (*Micrococcus luteus* A270, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) 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.

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 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 18 h sous agitation. Une culture témoin dans laquelle l'échantillon est remplacé par de l'eau stérile servira de contrôle. La croissance bactérienne est mesurée par A_{620} nm à l'aide d'un lecteur de plaque Titretrek Multiscan MCC. L'activité antibactérienne est mise en évidence par la différence d' A_{620} nm existant entre les fractions testées et l' A_{620} nm pour 100 μl de culture témoin. La concentration minimale inhibitrice (CMI100) correspond à la plus faible concentration de peptide qui inhibe totalement la croissance bactérienne.

Les tests antimicrobiens en milieu liquide permettent de calculer un pourcentage d'inhibition de croissance des micro-organismes en fonction de différentes concentrations de peptides :

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

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.

5.8.2 Activité antifongique

Les souches de champignons filamenteux testés sont : *Neurospora crassa* (CBS327-54) et *Aspergillus fumigatus*. Les spores sont séparées à partir des champignons filamenteux cultivés sur un milieu cinq céréales. Les spores récupérées sont resuspendues 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, on additionne au milieu avec de la

5.8. CARACTÉRISATION DES ACTIVITÉS BIOLOGIQUES

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. L'inhibition de la croissance par rapport à la culture témoin est vérifiée en microscopie optique.

L'activité contre les levures est évaluée de la même manière que l'activité antibactérienne, en utilisant les cellules de *Candida albicans* mises en culture dans le milieu de Sabouraud (24 h à 30°C).

5.8.3 Activité antiplasmodiale

Le peptide a été testé sur la souche Africaine chloroquino-sensible 3D7 de *Plasmodium falciparum*, souche aimablement fournie par le professeur S. Picot (EA 3732 Parasitologie, Mycologie Médicale et Pathologie Exotique, Faculté de Médecine, Université Claude Bernard, Lyon France) et le Prof. J. Le Bras (EA 209 Centre National de Référence pour la Chimiosensibilité du Paludisme, APHP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France). La souche est maintenue en culture dans des érythrocytes de types O+ (Etablissement Français du Sang, Strasbourg, France), dans du milieu de culture MCM pH 7,4 (*malaria culture medium*). Le MCM se compose de RPMI 1640 supplémenté avec 2 mM de L-glutamine, 10 mM d'Hepes (Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 1 $\mu\text{g/ml}$ d'hypoxanthine, 0,11 mg/ml de Na pyruvate, 0,02 mg/ml de gentamycin et 10 % (V/V) de *serum alpha calf* (Perbio Science, Brebières, France). Pour les tests, la culture est ramenée à 1 % d'hématocrite et 1 % de parasitémie. Une solution stock de 1mM du peptide est préparée et les concentrations finales à tester, 10 μM , 20 μM , 30 μM , 40 μM , 50 μM , 60 μM et 100 μM , sont diluées dans le MCM. L'effet antiparasitique du peptide est déterminé à 48 h par un test pLDH-ELISA.

La lactate déshydrogenase (pLDH), une enzyme métabolique intracellulaire spécifique de *Plasmodium*, est mesurée en utilisant un kit ELISA commercial, selon les recommandations du fabricant (DiaMed ELISA Malaria Antigen test, Cressier sur Morat, Switzerland).

La CI50 est déterminée lors de plusieurs concentrations croissantes de peptide en mesurant la DO spécifique exprimée en pourcentage d'activité (production de pLDH).

5.8.4 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 toxicité. Un ml de sang de souris est recueilli en présence de 10 mg de citrate de sodium afin d'éviter la coagulation. Le sang est centrifugé 2 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 de 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 %. On détermine ainsi pour une concentration donnée de peptide, son aptitude à lyser les érythrocytes.

5.9 Digestion protéolytique par l'endoprotéase Glu-C de *Staphylococcus aureus* V8

Les digestions menées avec l'endoprotéase Glu-C (Miles Laboratories Ltd, UK) sont réalisées pendant 19 h à 37°C avec un ratio enzyme/substrat de 1/50 (m/m) dans un tampon Tris-HCl 50 mM pH 8.

5.10 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 extra-focaux inférieur et supérieur, enregistrée en microscopie confocale conventionnelle. De plus il est possible de réaliser des doubles marquages.

Les cellules chromaffines bovines sont mises en culture sur les lamelles *fibronectin-coated*. Les cellules ont été fixées pendant 15 min avec paraformaldehyde 4 % (dans un tampon sodium/potassium phosphate 0,12 M, pH 7,0). La perméabilisation des membranes a été effectuée avec une solution de Triton X-100 0,1 % (v/v) dans du paraformaldehyde 4 % pendant 10 min. Après une série de lavages dans du PBS, les lamelles ont été saturées 1h dans le sérum albumine bovine 3 % (m/v ; BSA, Euromedex) dans du PBS afin de diminuer le marquage non spécifique. Les cellules ont alors été incubé pendant 1h à TA avec les anticorps primaires suivants :

1. anticorps monoclonal de souris dirigé contre la CGA47-68 (5A8) dilué 1/5000 (don du Dr. A. Corti, San Raffaele Scientific Institute, Milan, Italie).
2. anticorps monoclonal de souris (FK2, Biomol, UK) reconnaissant les protéines ubiquitinées dilué au 1/1000.
3. anticorps polyclonal de lapin reconnaissant l'enzyme *ubiquitin-activating* (E1A/B, Biomol, UK) dilué au 1/1000.
4. anticorps monoclonal de souris (Stressgen, Canada) reconnaissant l'ubiquitine dilué au 1/200.

5. anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la CGA (cassandre) dilué au 1/4000.

Après une série de lavage dans du PBS (5 fois, 30 min), les lamelles ont été incubées pendant 45 min à TA avec les anticorps secondaires :

1. anticorps d'âne anti-IgG de souris couplé à l'AlexaFluor 488 dilué au 1/2000.
2. anticorps d'âne anti-IgG de lapin couplé à l'AlexaFluor 555 dilué au 1/2000.

Après une série de lavage dans du PBS (5 fois, 30 min) les lamelles ont été rincées à l'eau. Le montage des lamelles a été réalisé avec une goutte de Mowiol 4-88 sur des lames porte-objet en verre.

Nous avons utilisé un microscope Zeiss (LSM 510 invert) équipé d'un objectif à immersion (X63) et d'un laser hélium/néon à 543 nm et argon 488 nm.

5.11 Vidéomicroscopie en temps réel

Afin d'étudier l'interaction du peptide étudié avec *N. crassa*, nous avons réalisé une étude par vidéomicroscopie en temps réel. Les champignons sont enchâssés dans un *plasma clot* (Briolat et al., 2005) pour les fixer au fond des boîtes de Pétri. Les cultures sont maintenues à 30°C dans la chambre de microscope inversé (Axiovert 200, Zeiss), équipé d'une caméra digitale (Codsnap f χ , Roper Scientific). Les images sont prises toutes les 30 min et les films sont obtenus en utilisant le logiciel Metaview (Universal imaging). La croissance des champignons est enregistrée durant 2 à 6 h pour évaluer la croissance des champignons en condition contrôle. Les peptides rhodaminés sont directement ajoutés au milieu de culture à une concentration de 0,1 à 1 μ M, puis un enregistrement est réalisé durant une période de 2 à 6 h. Afin de visualiser les sites d'incorporation des peptides, les images sont prises à la fois en contraste de phase, ainsi qu'en utilisant des filtres fluorescents appropriés.

5.12 Technique Bio-Plex[®]

Nous avons mis au point le technique Bio-Plex[®] afin de caractériser l'association entre deux protéines : l'ubiquitine est la chromogranine A.

Dans cette technique les anticorps de capture, fixés sur les microbilles fluorescentes de polystyrène (diamètre 5,6 μ m) reconnaissent l'ubiquitine (FIG. 23A) ou les protéines ubiquitinées (FIG. 23B) alors que la CGA est reconnue par l'anticorps biotinyllé de détection (révélé par le streptavidine-phycoérythrine). Ce complexe (anticorps de capture-protéine-protéine-anticorps de détection) est évalué par un fluorimètre en flux (Bio-Plex[®]) étant constitué de deux lasers, le premier, 635 nm, excite le colorant à

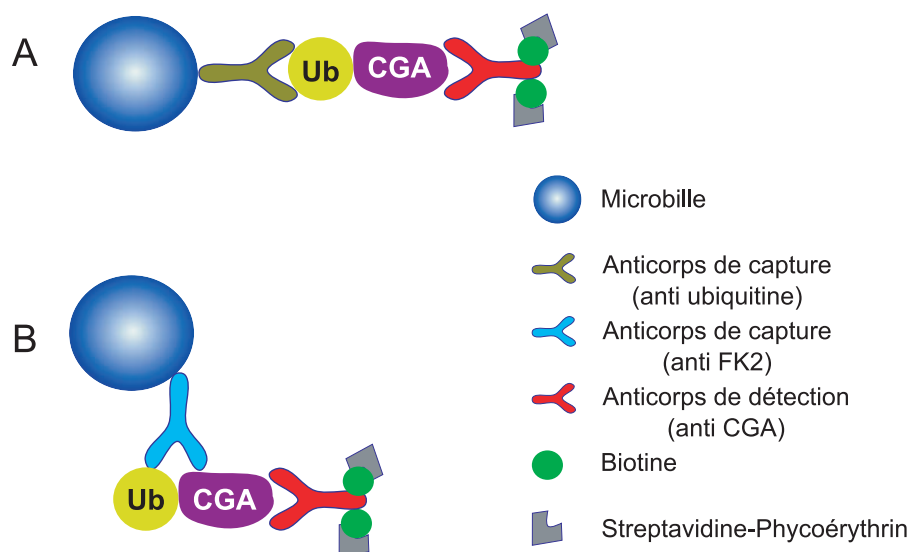


FIG. 23: Caractérisation de l'association de l'ubiquitine et la CGA par la technique du Bio-Plex®.

l'intérieur des microbilles. Le second laser, 532 nm, excite le fluorophore rapporteur attaché à l'anticorps spécifique de détection (phycoérythrine). Les agrégats de billes sont éliminés sur la base de leur taille (FCS).

5.12.1 Couplage des anticorps de capture aux microbilles

Les anticorps de captures (FK2 ou anti-ubiquitine monoclonale) sont fixés sur les microbilles d'une manière covalente en utilisant le kit de couplage de Bio-Plex® (BIO-RAD USA) : 100 μ l de microbilles ($1,25 \times 10^6$) sont activées en incubant avec 10 μ l EDC (1-Ethyl-3-(3-Diméthylaminopropyl) carbodiimide) (50 mg/ml) et 10 μ l S-NHS (Sulfo-N-hydroxy succinimide) (50 mg/ml) pendant 20 min à température ambiante (TA). Après deux lavages avec du PBS pH 7,4, 10 μ g d'anticorps de capture sont ajoutés aux microbilles dans du PBS (volume final 500 μ l) puis incubés pendant 2 h à TA. Ensuite les microbilles sont lavées deux fois avec 500 μ l de PBS et reprises dans le tampon de blocage pendant 30 min à TA. A la fin, les microbilles sont lavées deux fois avec du PBS et reprises dans 150 μ l du tampon de stockage. Durant toutes les incubations, les tubes sont mis à l'abri de la lumière.

5.12.2 Biotinylation des anticorps de détection

Les anticorps de détection (anti-CGA mono- ou polyclonal) sont biotinylés en incubant avec du Sulfo-NHS-Lc-Biotin (Molecular Probes, USA) 25 mM dans l'eau

(rapport NHS/ anticorps 25) pendant 1 h à température ambiante sous agitation. À la fin, 500 μ l d'éthanolamine, pH 8,5 sont ajoutés (concentration finale 10 mM) afin de bloquer la réaction.

5.12.3 Caractérisation de l'association entre l'ubiquitine et CGA au niveau de la membrane des granules chromaffines

100 μ g de protéines membranaires des granules chromaffine (PMG) sont incubés avec 5000 microbilles déjà couplées aux anticorps de capture pendant 1 h à TA sous agitation dans des plaques à filtre à 96 puits (Milipore, USA). Après deux lavages avec du PBS, les microbilles sont incubées avec des anticorps de détection biotinylés (concentration finale 5 μ g/ml) pendant 30 min à TA sous agitation. Après deux lavages par du PBS, 50 μ l de la solution de streptavidine–phycoérythrine (2 μ g/ml) (Molecular Probes, USA) est ajoutée dans chaque puits et la plaque est incubée pendant 30 min à TA sous agitation. Finalement, les microbilles sont lavées deux fois et reprises dans 125 μ l de PBS par puits. La mesure de l'intensité de fluorescence est faite en utilisant le système Bio-Plex[®] (BIO-RAD, USA) de l'équipe EA 3432 (Dr G. Prevost).

5.13 Méthodes bioinformatiques

Détermination de séquences : 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 les logiciels disponibles sur le site *EXPASY* (<http://www.expasy.org/>) : point isoélectrique, des modifications post-traductionnelles, alignements de séquences, recherches d'homologies. La prédiction de structure secondaire des peptides dérivés des chromogranines à partir de leur séquence, a été faite en utilisant le logiciel *PSIPRED* disponible sur le site d'*EXPASY* (McGuffin et al., 2000).

Publications

6 Publications

6.1 Introduction au manuscrit n°1

Ubiquitination machinery at the membrane level of bovine chromaffin secretory vesicles : a new role for CGA ? (soumis à *Cellular and Molecular Life Sciences*)

Les granules de sécrétion des cellules chromaffines de la médullo-surrénale contiennent avec les catécholamines une grande variété de molécules (prohormones, neurotransmetteurs...) qui sont sécrétées dans la circulation dans les états de stress. En 2003, notre équipe a montré que l'ubiquitine est sécrétée par les cellules chromaffines stimulées et possède des activités antimicrobiennes (Kieffer et al., 2003), qui ont été par la suite confirmées par une autre équipe (Yoshio et al., 2003). De plus, la présence de tyrosine hydroxylase ubiquitinée a été montrée au niveau de la membrane des granules chromaffines (Døskeland et Flatmark, 2002). Ces résultats suggèrent la présence de la machinerie d'ubiquitination au niveau des granules chromaffines. Afin de démontrer cette hypothèse nous avons entrepris une étude pour caractériser la présence d'enzymes d'ubiquitination-déubiquitination et de protéines mono et polyubiquitinées au niveau des vésicules de sécrétion des cellules chromaffines.

Cette étude, qui inclut un fractionnement subcellulaire minutieux, a été menée en utilisant la combinaison de techniques de biologie cellulaire et microscopie confocale, de Western blot, d'analyse protéomique précédée d'une chromatographie d'affinité et de la technique multiplex. Nous démontrons par ce travail que **la dégradation des protéines par la voie du protéasome peut avoir lieu au niveau de la membrane des granules chromaffines** avec l'identification d'ubiquitine, de poly-ubiquitine, de protéine poly-ubiquitinée (histone H1.1), d'enzyme d'activation de l'ubiquitination et de l'enzyme de déubiquitination UBC5.

La chromogranine A est une protéine majoritaire de la matrice des granules chromaffines, également présente au niveau de la membrane des granules chromaffines. Pour la première fois nous montrons que cette protéine possède un site de reconnaissance à l'ubiquitine très conservé au cours de l'évolution, structuré en hélice alpha et participant à la polymérisation de la CGA. Ce site appartient à la famille *Ubiquitin Interacting Motif* et suggère que **la chromogranine A participe à la machine-**

rie d'ubiquitination présente sur la membrane des granules chromaffines.

Ubiquitination machinery at the membrane level of bovine chromaffin secretory vesicles: a new role for CGA?

Peiman Shooshtarizadeh^a, Jaroslava Ciesielski-Treska^b, Thomas Lavaux^{c,d}, François Delalande^a, Daniel Keller^e, Alain van Dorsselaer^f, Youssef Haïkel^g, Dominique Aunis^a, Francis Schneider^c, Gilles Prévost^e, Marie-Hélène Metz-Boutigue^a

^a Inserm U575, Physiopathologie du Système Nerveux, 5 rue Blaise Pascal Strasbourg, (France)

^b Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, CNRS UMR-7168, IFR 37 des Neurosciences, Centre de Neurochimie, 5 rue Blaise Pascal Strasbourg, (France)

^c Département de Réanimation Médicale Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, (France)

^d Pôle de Biologie, Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, (France)

^e EA 3432, Institut de Bactériologie, Université Louis Pasteur-Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 3 Rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, (France)

^f CNRS, UMR 7512, Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Strasbourg, (France).

^g Faculté de chirurgie dentaire, 1 place de l'hôpital, 67000 Strasbourg, (France)

*Corresponding author: Marie-Hélène Metz-Boutigue

E-mail: metz@neurochem.u-strasbg.fr; Tel. (+33)3 88 45 66 09; Fax (+33)3 88 60 08 06.

Running title: Ubiquitinated proteins in chromaffin secretory vesicles

Abstract

The chromaffin secretory vesicles contain with catecholamines a variety of products such as prohormones, neurotransmitters, as well as the factors necessary for the maintenance of internal vesicular conditions, vesicular trafficking, and exocytosis. The complexity of proteins functions in these vesicles is required for cell cell communication to control homeostasis recovery during stress. We and others have reported the presence of ubiquitin, but the presence and subcellular localization of ubiquitination enzymes has not yet been described. In the present study we investigated the presence of Ub, ubiquitinated conjugates and enzymes of the ubiquitination machinery in bovine chromaffin cells in culture, as well as in purified secretory chromaffin granules using confocal microscopy, Western blot, proteomic analysis including affinity chromatography, liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (nano LC-MS/MS) and bead-based immunoassay. Our study reports that Ub-targeted protein degradation may occur in chromaffin secretory vesicles membranes with the detection of Ub, poly-Ubiquitin, Ub-conjugated histone H1.1, Ub-activating enzyme and deubiquitinating enzyme UBCH5. Finally, we discussed that CGA contains an highly conserved inverted Ub interacting motif (IUIM) [1] suggesting its involvement with the ubiquitination machinery.

Introduction

The dense core secretory vesicles of chromaffin cells from adrenal medulla are known to provide an excellent model for investigating secretory vesicle mechanisms that participate in producing peptide hormones and neurotransmitters in neuroendocrine systems. These secretory granules contain with catecholamines a variety of products such as prohormones, neurotransmitters, as well as the factors necessary for the maintenance of internal vesicular conditions, vesicular trafficking, and exocytosis [2,3]. Comparison of soluble and membrane protein components demonstrated similarities and differences in functional categories consisting of prohormones and neurotransmitter factors, protease components, neurotransmitter factors, neurotransmitter metabolizing enzymes and redox regulation [3]. These recent data demonstrate the complexity of protein functions in dense core secretory vesicles for the biosynthesis, storage and secretion of peptide hormone and neurotransmitters molecules for cell-cell communication required for control of physiological functions during stress [3].

To generate active neuropeptides and neurohumoral factors, a majority of the prohormones undergo further posttranslational modifications such as glycosylation, phosphorylation and proteolytic processing [4-7]. The chromogranins A and B (CGA and CGB) are the major prohormones present in the chromaffin granules and previously we shown the presence of free ubiquitin (Ub) in secretory granules and in the secretions of stimulated chromaffin cells [8]. The presence of Ub in secretions was also reported in vernix caseosa, a lipid rich substance that covers the skin of the fetus and is present also on the skin of newborns [9] and a recent proteomic analysis of soluble and membrane chromaffin vesicle proteins confirmed the presence of Ub [3].

Ub is a short protein of 76 residues [10], found in all eukaryotic cells with a well conserved sequence from protozoan to vertebrates [11]. It conjugates to intracellular target proteins, in a process involving three separate enzymatic activities that appears to be the first step for selective protein degradation by the 26 S proteasome and serves as a signal for the endocytosis of plasma membrane proteins [12]. Tyrosine hydroxylase has been reported to be mono-ubiquitinated in the membrane of chromaffin granules [13], but the presence and subcellular localization of ubiquitination enzymes as the principle factors of ubiquitination machinery in chromaffin cells has not yet been reported.

In the present study we investigated the presence of Ub, ubiquitinated conjugates and enzymes of the ubiquitination machinery in bovine chromaffin cells in culture, as well as in

purified secretory chromaffin granules using confocal microscopy, Western blot, proteomic analysis including affinity chromatography, liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (nano LC-MS/MS) and bead-based immunoassay. Finally, we discuss that CGA contains an highly conserved inverted Ub interacting motif (IUIM) [1] suggesting its involvement with the ubiquitination machinery.

Materials and methods

Culture of chromaffin cells

Chromaffin cells were isolated from fresh bovine adrenal glands by retrograde perfusion with collagenase and purified on self-generating Percoll gradients [14]. Cells were cultured on fibronectin-coated glass coverslips at a density of 2×10^5 . Experiments were performed 3-7 days after plating.

Antibodies

Rabbit polyclonal anti-CGA antibody [15] and mouse monoclonal anti-CGA antibody [16] were used at dilution 1: 2000 and 1: 5000 respectively. Mouse monoclonal antibody to Ub (SPA-203 Stressgen Bioreagents, Canada) and to ubiquitinated proteins (clone FK2) (Affinity Research Products, UK) [17] were used at 1:1000 dilution. Rabbit polyclonal antibody to ubiquitin-activating enzymes (E1A/B) (Affinity Research Products, UK) was used at 1: 2000 dilution according to the method previously reported [18].

Immunofluorescence and confocal laser microscopy

Chromaffin cells grown on fibronectin-coated coverslips were fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde in 0.12 M sodium/potassium phosphate, pH 7.0, and for a further 10 min in fixative containing 0.1% (v/v) Triton X-100. Following several rinses with phosphate-buffered saline (PBS), cells were pretreated with 3% (w/v) bovine serum albumin (BSA), 10% (v/v) normal goat serum in PBS to reduce nonspecific staining. Cells were then incubated for 1 h with primary antibodies. After washing with PBS (5 changes, 30 min), the coverslips were incubated for 1 h with labeled goat anti-rabbit or anti-mouse Alexa Fluor 568 secondary antibodies (Molecular Probes, USA). Coverslips were subsequently washed with PBS (5 changes, 30 min) and mounted in Mowiol (Calbiochem, France). Mounted coverslips were examined with a Axioscop microscope (Zeiss, Germany) equipped with an epifluorescence system and appropriate filters. Sequential through-focus images of labeled

cells were obtained using a Zeiss laser scanning confocal microscope (LSM 410 invert) equipped with a planapo oil (63x) immersion lens (n.a. = 1.4) and argon 488 nm and a He/Ne 543 nm lasers. The emission signals were filtered with a 515-565 nm filter (FITC) or with a long pass 595 nm filter (TRITC). The images were recorded using identical laser power, wavelength and PM tube voltage.

Preparation of proteins from subcellular fractions of chromaffin cells

Subcellular fractions of chromaffin cells (intragranular and granule-membrane bound-proteins) were isolated from bovine adrenal medulla dissected from 30 glands, using a density sucrose gradient procedure as described previously [8].

Immunodetection of ubiquitinated proteins and Ub-activating enzyme (E1) in subcellular fractions of chromaffin cells

The subcellular fractions were separated on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel SDS-PAGE (15%) electrophoresis as previously described [8]. To investigate in more detail the presence of PEBP in granule membranes, the membranes were separately treated for 1 h at 4°C with a buffer A containing with 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM sodium Hepes pH7; a buffer B, similar to buffer A with 1% (v/v) Triton X-100 (Euromedex, France) and a buffer C, as in buffer A with 0.1% (v/v) saponin [19].

Western blot analysis was carried out using mouse anti-Ub monoclonal antibody (SPA-203 Stressgen Bioreagents, Canada) at 1:1000 dilution and rabbit polyclonal antibody to ubiquitin-activating enzymes (E1A/B) (Affinity Research Products, UK) at 1: 2000 dilution according to the method previously reported using polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Amersham Biosciences, Germany) [18].

Affinity purification of ubiquitinated conjugates and SDS-PAGE

Proteins from membrane chromaffin granule extract were applied to a FK2-Sepharose HiTrap column (1 ml) (Amersham Biosciences, Sweden) equilibrated with buffer A that contained 75 mM Tris-HCl, pH 8. After washing with 25 ml of buffer A, adsorbed materials were eluted with 2 ml of 0.5 M NaCl, 100 mM Glycine-HCl, pH 2.7. Collected fractions were quickly neutralized by adding 100 µl 1 M Tris-HCl, pH 8.5 for 1 ml of fraction, followed by desalting through reverse-phase HPLC using a Lichrospher 100-5-RP-18 column (3 x 250 mm; particle size 5 µm and pore size 100 nm) (Macherey Nagel, France). Chromatographed fractions were concentrated by evaporation and dissolved in SDS-PAGE sample buffer with DTT [20],

heated (100 °C for 3 min), and subjected to SDS-PAGE (Criterion gels 4-15% gradient) (Bio-Rad, USA). Finally, the gel was visualized with Coomassie blue G250 staining before mass spectrometry analysis.

Mass spectrometry analysis.

In gel digestion was performed with an automated protein digestion system, MassPREP Station (Waters, Millford, USA). The gel slices were washed three times in a buffer containing 25 mM NH₄HCO₃: CH₃CN (1:1, v/v). The cysteine residues were reduced by 50 µl of 10 mM DTT at 57°C and alkylated by 50 µl of 55 mM iodoacetamide. After dehydration with acetonitrile, the proteins were cleaved in gel with 40 µl of 12.5 ng/µl of modified porcine trypsin (Promega) in 25 mM NH₄HCO₃ at 37°C for 4 hours. The tryptic peptides were extracted with 60% acetonitrile in 5% formic acid, followed by a second extraction with 100% (v/v) acetonitrile.

The extracted peptides were analyzed by nanoLC-MS/MS on an Agilent 1100 Series HPLC-Chip/MS system (Agilent, Santa Clara, USA) coupled to an HCT Ultra ion trap (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The voltage applied to the capillary cap was optimized to -1850V. For tandem MS experiments, the system was operated with automatic switching between MS and MS/MS modes. The three most abundant peptides, preferring doubly charged ions, were selected on each MS spectrum for further isolation and fragmentation. The MS/MS scanning was performed in the ultrascan resolution mode at a scan rate of 26,000 m/z per second. A total of 6 scans were averaged to obtain a MS/MS spectrum. The complete system was fully controlled by ChemStation (Agilent) and EsquireControl (Bruker Daltonics) software. The mass data recorded during nanoLC-MS/MS analyses were processed and converted into peak list. The obtained data were searched using a local Mascot server (version MASCOT 2.2.0, MatrixScience). The MS/MS data were analyzed against the NCBI protein database.

Searches were performed with a mass tolerance of 250 ppm for MS mode and 0.4 Da in MS/MS mode for nanoLC-MS/MS analysis without constraining protein molecular weight or isoelectric point and without any taxonomic restriction. One missed cleavage per peptide was allowed and proteins modifications were taken into account : oxidized methionine (+16), carboxyamidomethylated cysteine (+57) and ubiquitinated lysine (+114). For identification of ubiquitinylation sites, every peptide was manually verified to identify the precise site.

Bead-based immunoassay. Ub or ubiquitinated proteins are captured by its specific antibody coupled to a dyed bead while CGA will be recognized by biotinylated antibody and streptavidin-phycoerythrin. The whole complex is evaluated by Bioplex reader (Bio-Rad, USA) consisting of two laser measurements. The first laser (635 nm) detects and measures the size of the beads (5.6 μm) (Forward Scatter, FSC) to eliminate the aggregates. The second laser (532 nm) detects and quantifies the fixed phycoerythrin. The results are given in arbitrary units of fluorescence.

Capture antibodies (FK2 or anti-ubiquitin mAb) were covalently coupled to 5.5 μm dyed carboxylated polystyrene beads *via* carbodiimide reactions using Bioplex amine coupling kit (BIO-RAD, USA) according to the manufacturer's advice. In brief, 100 μl beads (1.25×10^6) were activated through incubation with 10 μl EDC (1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) carbodiimide) (50 mg/ml) and 10 μl S-NHS (Sulfo-N-hydroxy succinimide) (50 mg/ml) 20 min at room temperature (RT). After washing the beads two times with PBS pH 7.4, capture antibody was added (10 μg) to the beads in PBS to a final volume of 500 μl . After 2 h incubation at RT, the beads were washed with 500 μL of PBS pH 7.4 and resuspended in blocking buffer for 30 min at RT. Finally the beads were washed two times and resuspended in 150 μL of storage buffer. Coupling was verified using biotinylated rabbit anti-mouse immunoglobulin antibody and streptavidin-PE. All incubations were done in the dark. Biotinylation of detection antibodies (mouse monoclonal or rabbit polyclonal anti-CGA) was done using Sulfo-NHS-Biotinylation kit (PIERCE, USA). Results were from two similar experiments, each performed in triplicates.

Statistical analysis. Group data are presented as mean \pm SD (as specified in the text and figure legends). Student's test was used to determine the significance of data (*), $p < 0.05$.

Results

Subcellular localization of Ub, Ub-activating enzyme E1 and ubiquitinated proteins in chromaffin cells culture

We examined the intracellular distribution of Ub and ubiquitin-activating enzyme E1 in cultured chromaffin cells by confocal microscopy and immunofluorescence. Chromaffin cells were identified with polyclonal anti-CGA antibody, which specifically labels chromaffin secretory granules. Using monoclonal anti-Ub antibody, we observed a diffuse as well as a punctuate pattern of fluorescence over the whole cell body (Figure 1). Double immunofluorescence experiments indicated that a proportion of the cellular Ub is associated with the secretory granules (Figure 1, Merge and Mask), in agreement with our previous observations [8]. In addition, Ub-activating enzyme E1 immunoreactivity was detected both in the cytosol and partially associated with secretory granules (Figure 1, Merge and Mask).

To further investigate the presence of ubiquitination machinery in chromaffin cells, we examined the intracellular distribution of ubiquitinated proteins using FK2 monoclonal antibody, which recognizes both mono- and poly-ubiquitinated proteins but not free Ub (Figure 2). While most of chromaffin cells in culture display a flat morphology compatible with a secretory phenotype (Figure 2 B), some chromaffin cells develop cellular extensions and neuritis in which secretory granules can be easily visualized at the optical level (Figure 2 A). Double-labeling experiments with polyclonal anti-CGA antibody and with monoclonal FK2 antibody confirmed that chromaffin cells with either neuronal or secretory phenotype contain ubiquitinated proteins in the cytosol, partially associated with the secretory granules (Figure 2, Merge and Mask).

Immunodetection of ubiquitinated proteins and Ub-activating enzyme E1 in subcellular granular fractions of chromaffin cells

To confirm the presence of ubiquitinated proteins and Ub-activating enzyme E1, subcellular fractions of bovine chromaffin cells (soluble chromaffin granule proteins, and membrane chromaffin granule proteins) were isolated from bovine adrenal medulla. No inter fraction contamination was observed as verified by Western blot using anti-phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) as cytoplasmic marker and anti-CGA as granular marker (results not shown). Each fraction was subjected to SDS-PAGE (Criterion gels, 4-15% gradient) and electrotransferred to a PVDF membrane. The four fractions showed immunoreactivity using the monoclonal anti-Ub (Figure 3A) and the granular membrane fraction was the most reactive, showing an intense labeling (Figure 3A, lane 1). Ubiquitination often causes

heterogenous modified substrates that display as ladder on Western blot in case of unique purified protein and a smear of immunoreactivity in case of several mixed ubiquitinated proteins like here. The low molecular weight immunoreactive band corresponds to free Ub (Figure 3A, lanes 1 and 4).

Ubiquitination of proteins is achieved by the sequential action of three distinct enzymes: the Ub-activating enzyme (E1), Ub conjugating enzymes (E2s) and Ub ligases (E3s) [21,22]. We next sought to determine the presence of E1 which plays a key role in the first step of ubiquitination pathway. E1 was detected in all four fractions (cytosol, soluble chromaffin granule proteins, microsome and membrane chromaffin granule proteins) using anti-ubiquitin activating enzyme antibody (Figure 3B). The cytoplasmic fraction was the most reactive (Figure 3B, lane 1) and the membrane chromaffin granule proteins include the two forms E1a and E1b of E1. No inter fraction contamination was observed as verified by Western blot using anti-phenylethanol-amine N-methyltransferase (PNMT) as cytoplasmic marker and anti-CGA as granular marker (results not shown).

Identification of ubiquitinated proteins in the membrane of chromaffin granules by proteomic analysis

Since the chromaffin granules membrane fraction showed to be rich in ubiquitinated proteins, we chose it for further identification of these proteins. A preliminary experiment was obtained with Triton X-100 and saponin extraction of granule membrane proteins (Figure 4A). Numerous well-separated bands were detected after Coomassie blue G250 staining and the fractions 1-9 were submitted to a proteomic analysis using the nano LC MS-MS analysis. In relation with CGA the major protein present in chromaffin granules we detected it with an apparent molecular mass of 66 -70 kDa as previously reported [20], but also with an higher molecular mass (75-100 kDa). In this first experiment Ub was identified in bands 1-9 at a level corresponding to polyUb or ubiquitinated proteins. However, we have not detected a covalent linkage between Ub and its substrate. Furthermore, we have identified the Ub-carboxyl terminal hydrolase 5 (UBCH5), which corresponds to the deubiquitinating enzyme 5, with a apparent molecular mass close to 100 kDa (Figure 4A). Ubiquitinated proteins are usually present at a low level, due in part to proteasome-mediated degradation and the highly active deubiquitination enzymes in cells. Therefore, prior enrichment is advised for the identification of the ubiquitinated proteins [23,24]. To purify Ub-conjugated proteins, we performed immunoaffinity chromatography as described in Materials and methods with the mAb FK2 (FK2-Sepharose HiTrap column), which selectively recognizes the Ub moiety of

Ub-protein conjugates, but not free Ub [25]. The eluate from FK2 column was subjected to SDS-PAGE followed by Coomassie blue G250 staining (Figure 4B). Numerous discrete bands on a smeared background representing mono- and polyubiquitinated proteins were apparent. The proteomic analysis of the bands 1-42 indicates the presence of Ub [10] (molecular mass of 8565 Da, bands 6-42), Histone H1 (molecular mass of 20951Da, bands 6-42), CGA (molecular mass of 49984 Da, bands 8-21 and 38-42), the heat shock protein (hsp 27kDa, molecular mass of 17156 bands 13-16, 19-22, 27-31) and the peptidylpropyl isomerase (PPI, molecular mass of 24317 Da bands 24-31). These bands also likely include proteins that associate with Ub and ubiquitinated proteins.

The common method for validating ubiquitinated proteins is direct mapping of ubiquitination sites by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [26]. Following tryptic digestion, the original ubiquitin molecule is trimmed to a diglycine remnant (-GG) that adds a monoisotopic mass of 114 Da on the affected K residue of the substrate. Among different proteins identified in the eluate from FK2 column, only Ub and histone H1.1 were found with diglycine remnant. Thus, several polyUb (x2-x10) were identified involving the ubiquitination of the residue K₄₈ (Figure 4B). In addition, after the mass spectrometry analysis of the highlighted band in Figure 5A, residues K₃₃ and K₄₅ were found to be ubiquitinated in histone H1.1 (Fig. 5B, C) and the apparent molecular mass of this band suggest the presence of 2 monoubiquitination.

In the eluate from FK2 column we identified CGA and its derived peptides, but we have not obtained the diglycine remnant validation and in order to investigate the possible ubiquitination of CGA we decided to use the Bioplex technology.

Detection of ubiquitinated CGA by bead base immunoassay in the soluble and membrane granule proteins

In order do detect ubiquitinated CGA, proteic material from chromaffin granules (matrix and membranes 100 µg for each) were applied to a bead base immunoassay using an anti-Ub mAb as capture Ab (fixed on latex beads) or a FK2 mAb, specific for ubiquitinated proteins in combination with biotinylated anti-CGA mAb or anti-CGA pAb as detection Ab (Figure 6). By this approach the Ub and CGA moiety of ubiquitinated CGA complex, will be detected by capture and detection Ab respectively. We observed a remarkable increase in proteins present in chromaffin vesicles membranes by comparison with blank (Fig. 5), suggesting the presence of ubiquitinated CGA in these membranes.

Discussion

Secretory chromaffin granules are known to provide an excellent model for investigating secretory mechanisms that participate in producing hormones and neurotransmitters, which are released with catecholamines in response to stress *via* cholinergic receptor activation to regulate physiological systems. Our study reports that Ub-targeted protein degradation may occur in chromaffin secretory vesicles membranes with the detection of Ub, polyubiquitin, Ub-activating enzyme, deubiquitinating enzyme UBCH5 and Ub-conjugated histone H1.1. Thus, in chromaffin secretory granules the proteasome completes the existing components for protease and protease inhibitor systems and participate to the hormones and neurotransmitters formation complexity [3]. In addition, the presence of chaperones Hsp27 and peptidylpropyl isomerase suggests their involvement for regulating protein folding in chromaffin granules.

By nano LC MS-MS analysis following FK2 affinity chromatography and SDS-PAGE, for the first time we demonstrated the presence of polyubiquitin and the ubiquitination of histone H1.1. Previous data reported that Histones can be modified with mono Ub or short Ub chains for gene regulation [27].

Furthermore we have detected the presence of CGA, in gel slices of different apparent molecular weights. The fragments lower than the total CGA (66 kDa) correspond to the natural proteolytic processed fragments [20] and the higher forms suggest the possibility of weak amounts of di-or tetramerized or ubiquitinated forms of the complete CGA (Figure 4 B). Interestingly, short fragments corresponding to vasostatins (8-15 kDa) were also detected by mass spectrometry (Figure 4 B). These data are further sustained with the colocalisation of CGA and Ub or Ub-activating E1 enzyme detected with confocal microscopy. All together these data suggest the interaction of CGA and derived-fragments with Ub.

The surface region of Ub appears to be three-dimensional signals that are interpreted by the cell through interaction with distinct protein domains suggesting participation of Ub in non-proteosomal cellular roles. Several domains that directly bind to mono Ub or poly Ub chains are identified : the ub-interacting motif (UIM) , CUE, the Ub-associated domain UBA, the Ub E2 enzyme variant (UEV), two zinc finger domains (HDAC6 and NZF) [28].

Comparison of bovine CGA sequence with the different consensus sequences corresponding to the domains interacting with Ub indicate the homology of the inverted C-terminal sequence CGA₂₀₉₋₂₂₃ with an IUM, as previously reported for Rabex-5 [1]. UIMs are particularly prevalent in proteins that function in the pathways of endocytosis and vacuolar protein sorting [29]. These two linked pathways serve to sort membrane associated proteins and their cargo

from the plasma membrane for eventual destruction in the lysosome. In addition to binding monoUb, UIM promote the monoubiquitination of proteins within which they are carried [30-33]. One characterized function for monoubiquitin is as a regulated signal for membrane protein trafficking [34]. In yeast and mammalian cells, monoubiquitination is a necessary and sufficient signal for internalization of many cell surface proteins into the endocytotic pathway [35,36]. In addition to serving as a cargo sorting signal in the endocytic pathway, ubiquitination regulates the activity of transacting endocytic proteins [37] and protein-protein interactions. Like phosphorylation, modification with Ub likely regulate protein location, activity and binding partners.

The structure and Ub binding of the UIM indicates that these domains are structured in amphipathic helix, monomeric in solution but with the possibility of antiparallel four-helix bundle formation and bind to the L₄₄ surface of Ub [38]. It has been suggested that Ub tetramerization might prevent mono ubiquitination [38]. Interestingly, in relation with CGA it has been reported that the C-terminal region CGA₄₀₇₋₄₃₁ is responsible for dimerization and tetramerization of CGA and that this moiety of the protein might provide a structural stability of the whole molecule, thus facilitating the interaction of the N-terminal domain with the granule membrane [39]. We have previously characterized the post-translation modifications of bovine and human CGA, showing the presence of O-GlcNAc glycosylation [5,40] and it is important to point out that in addition to the oligomerization of CGA the presence of O-glycosylations might regulate its involvement in the ubiquitination machinery [41]. Exocytosis occurs via fusion of secretory granules with the cell membrane, where upon the granule content is at least partially released and the granule membrane is temporarily added to the plasma membrane. Exocytosis is balanced by compensatory endocytosis to achieve net equilibrium of the cell surface area and to recycle and redistribute components of the exocytosis machinery [42]. Previous studies reported that under physiological electrical stimulation, chromaffin cells internalise membrane via two distinct pathways that are separable. One is prevalent at basal stimulus frequencies, is lessened with increased firing, and is insensitive to cyclosporin A and FK506. A second endocytic form is activated by increased firing frequencies, and is selectively blocked by cyclosporin A and FK506 [43].

Finally, as proteins play crucial roles in biological mechanisms, the finely controlled equilibrium between their synthesis, processing and degradation influences cellular homeostasis. Whereas polyubiquitination of proteins labels them for degradation by proteasomes, monoubiquitination confers a cellular localization signal that directs them from the plasma membrane to endosomes and multivesicular bodies. In this context the data

presented here bring important information concerning the possibility of a new role for CGA in the ubiquitination machinery to regulate during stress the exocytosis-endocytosis mechanisms in chromaffin cells.

Acknowledgments

We gratefully thank T. Thahouly (INCI, UMR 7168) for the preparation of chromaffin cell cultures.

Figure legends

Figure 1. Intracellular distribution of ubiquitin and ubiquitin-activating enzyme E1 in chromaffin cells.

Confocal immunofluorescent images were obtained by labeling cells with anti-CGA polyclonal antibody visualized with rhodamine-conjugated secondary antibodies and with anti-ubiquitin monoclonal or anti-enzyme E1 polyclonal antibody visualized with fluorescein-conjugated secondary antibodies. Sections were taken with minimum pinhole size in the plane of the nuclei using excitation and emission filtering as described in Materials and Methods. Mask represents the region of colocalization obtained by selecting the double labeled pixels. Bar = 10 μ m.

Figure 2. Intracellular distribution of ubiquitinated proteins in chromaffin cells expressing either neuronal or neurosecretory-like phenotype.

A, neuron-like chromaffin cell and B, neurosecretory cell morphology. Chromaffin cells were labeled with anti-CGA polyclonal antibody revealed with rhodamine-conjugated secondary antibody and with FK2 monoclonal antibody revealed with fluorescein-conjugated secondary antibody. Confocal images were recorded in the same optical sections by a double-exposure procedure. Bar = 10 μ m.

Figure 3. Immunodetection of ubiquitinated proteins and ubiquitin-activating enzyme (E1A/B) in subcellular fractions of bovine chromaffin cells.

A, anti-ubiquitin monoclonal antibody: 1, cytosol 30 μ g; 2, microsome 15 μ g; 3, membrane granular proteins 25 μ g; 4, soluble granular proteins 25 μ g. B, anti-ubiquitin-activating enzyme (E1A/B) monoclonal antibody: 1, cytosol 1 μ g; 2, microsome 1 μ g; 3, membrane chromaffin granule proteins; 4, soluble granular proteins.

Figure 4. Proteomic analysis by nano LC-MS/MS of ubiquitinated conjugates from membrane chromaffin granule proteins.

A, Coomassie blue stained SDS-PAGE (4-15% gradient) of membrane chromaffin granule proteins after Triton X-100 and saponin extractions. Bands including CGA, Ub and UBCH5 are shown.

B, Coomassie blue stained SDS-PAGE (4-15% gradient) of ubiquitinated conjugates after FK2-Sepharose HiTrap column. Right, bands including Ub, Histone H1.1 (H1), CGA,

peptidylpropyl isomerase (PPI), heat shock protein (Hsp 27 kDa) are indicated; left, arrows show bands where the covalent link between Ub and the substrate was demonstrated (polyUB from x2 to x10) and H1-Ubx2.

Figure 5. Proteomic analysis by nano LC-MS/MS of ubiquitinated conjugate of H1.1 membrane chromaffin granule proteins.

A, Coomassie blue stained SDS-PAGE (4-15% gradient) of ubiquitinated conjugates; arrow shows the band corresponding to the ubiquitinated form of H1.1 B, Nano LC-MS/MS identification of ubiquitinated lysine residues of histone H1.1 corresponding to highlighted band in A. Upon tryptic digestion of ubiquitin conjugates, diglycine remnant (-GG, a monoisotopic mass of 114.04 Da) was linked to lysine residues. C, The sequence of bovine histone H1.1 fragment 1-104 (Swiss-prot P02253) [44]. The identified H1.1 derived sequences are underlined and the ubiquitinated lysines are bolded.

Figure 6. Detection of ubiquitinated CGA in membrane chromaffin granule proteins using bead-base immunoassay.

Dyed beads were coupled with proper mAb anti-Ub (A) or mAb FK2 (ubiquitinated proteins) (B) as capture antibodies, whilst biotinylated antibodies specific for CGA (mAb anti-CGA or pAb anti-CGA) were used as detection which provided the second signal using Streptavidin-Phycoerythrin. Simultaneous detection of the dyed bead and the second signal are interpreted as ubiquitinated CGA. For each sample at least 100 beads were evaluated. The capture Ab was mAb anti-Ub for 1 and 2 and mAb FK2 for 3 and 4. The detection Ab was mAb anti-CGA for 1 and 4 and pAb anti-CGA for 2 and 3. Fluorescence intensity was expressed with arbitrary units. Results were from two similar experiments each performed in triplicates and the data presented as mean +/-S.E.*, denotes significant increase ($p<0.05$).

Figure 7. An Inverted Ubiquitin Interacting Motif (IUIM) in CGA sequence.

A, UIM sequence with X non-conserved residues, “a” an acidic residue (E or D) and “h” a large hydrophobic residue (typically L) [38]. Alignment with human hepatocyte growth factor receptor substrate (hHrs) and human proteasome subunit S5a (hS5a) [1]. B, the natural proteolytic cleavage sites of CGA [20] and C, the secondary structure prediction of CGA₃₈₇₋₄₃₁ according to GOR secondary structure prediction method [45].

Figure 1.

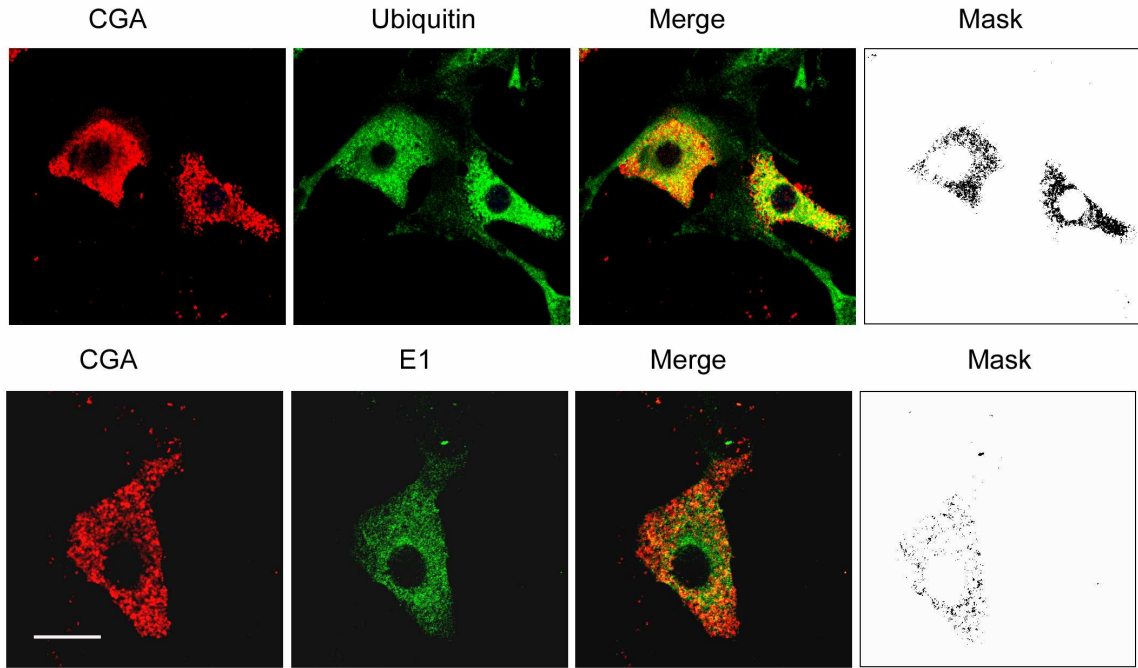
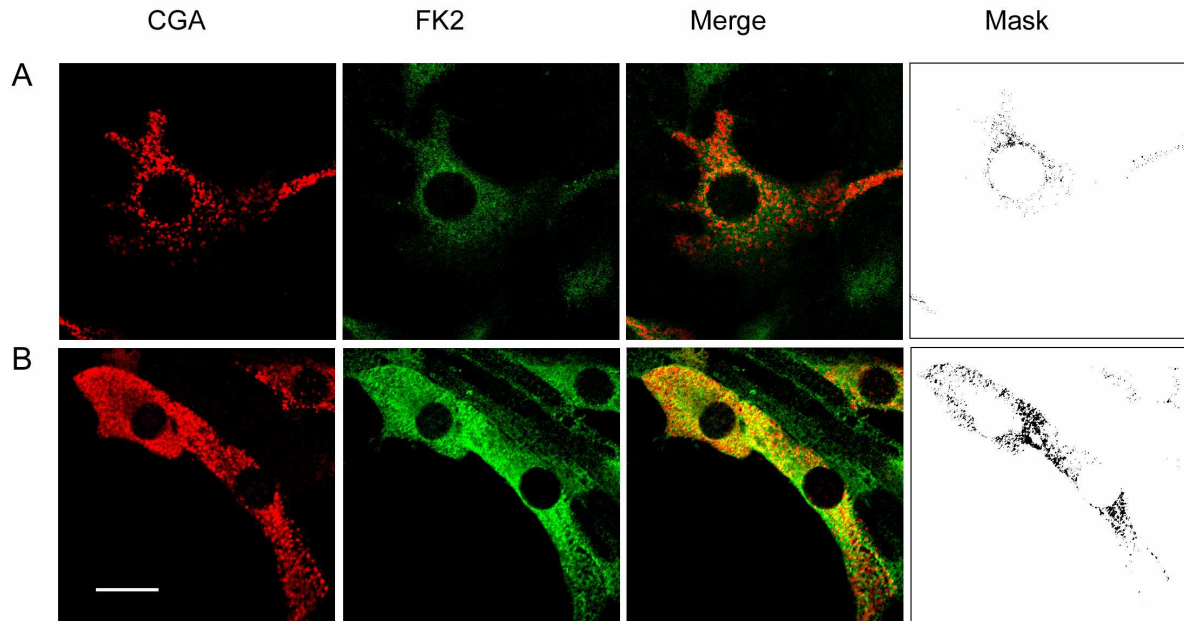


Figure 2.



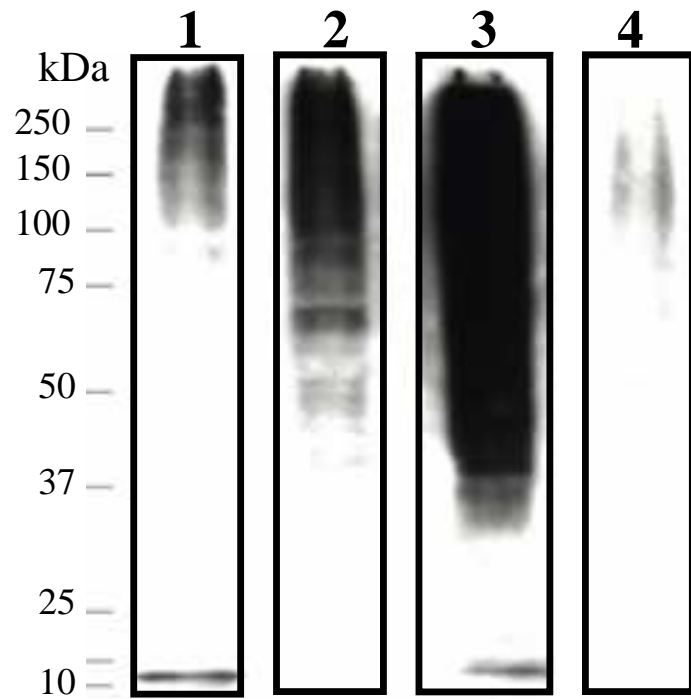


Figure 3A.

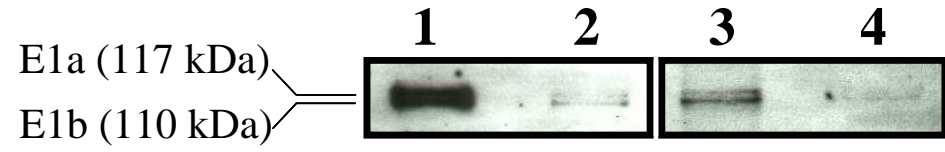


Figure 3B.

Figure 4.

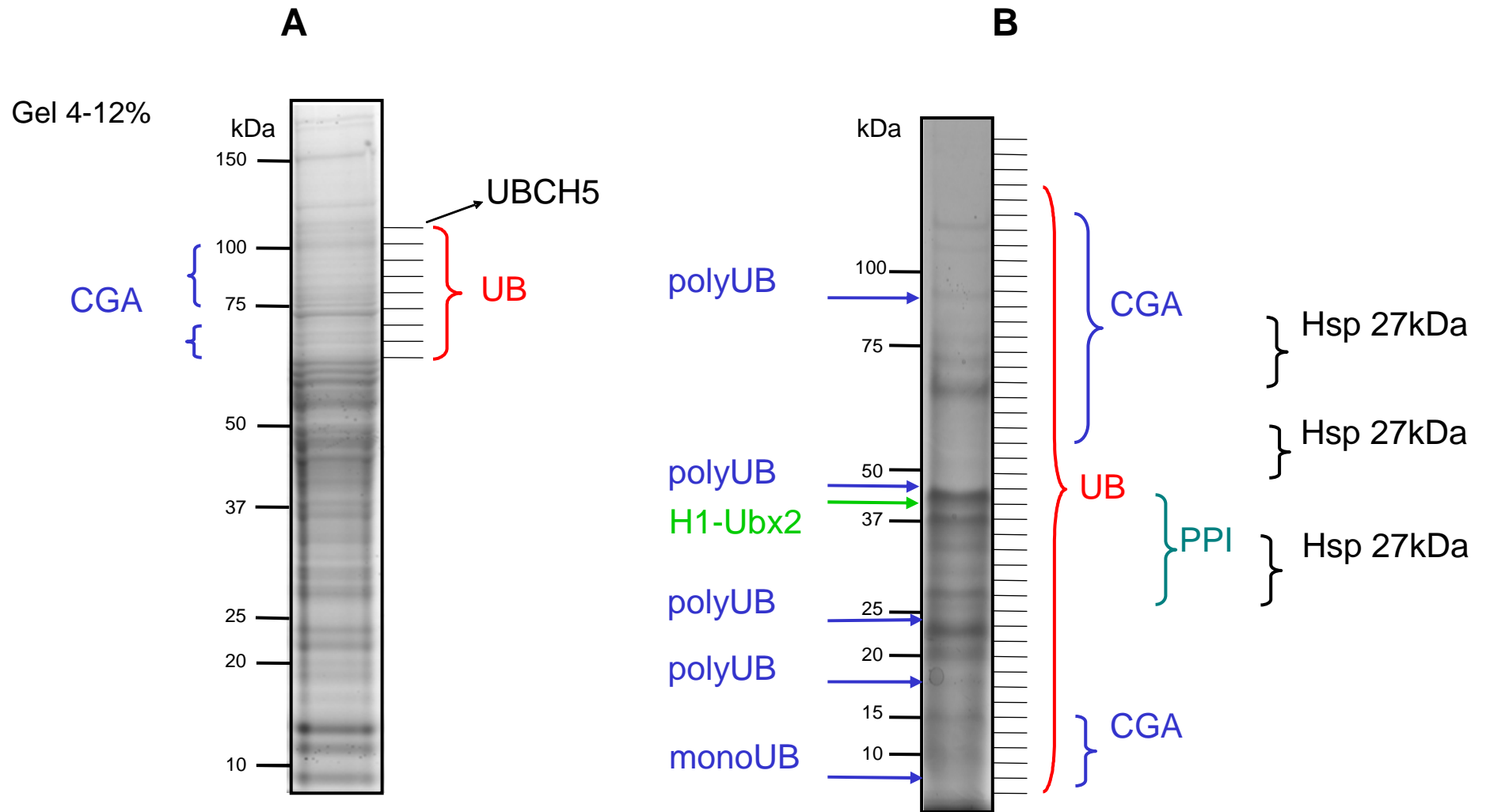


Figure 5

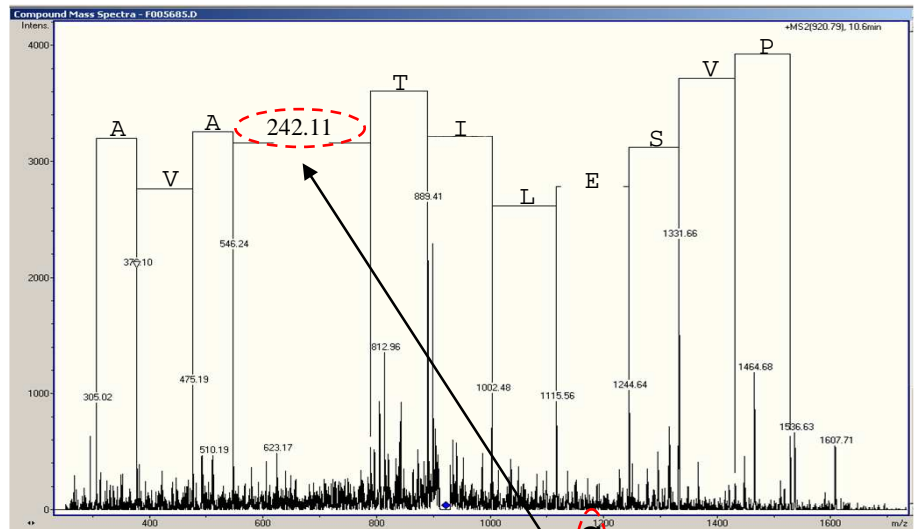
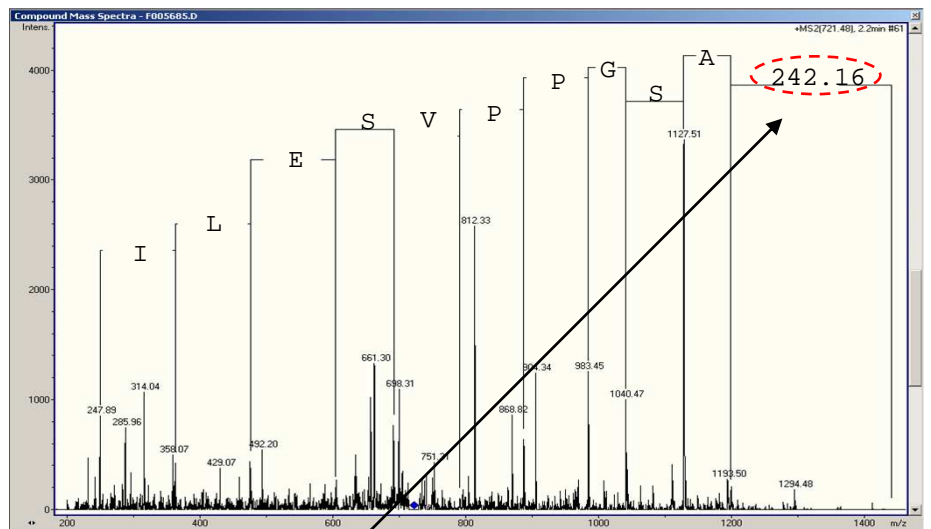
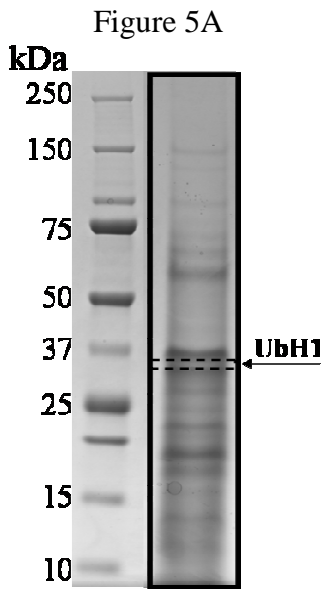


Figure 5B

ASGPPVSELITKAVAASK



KASGPPVSELITK

Figure 5C

SETAPAAPAAAPPAEKTVPVKKKAAKKPAGARRKASGPP

VSELITKAVAASKERSGVSLAALKKALAAAGYDVEKNN

SRIKLGLKSLVSKGTLVQTKGTGASGSF

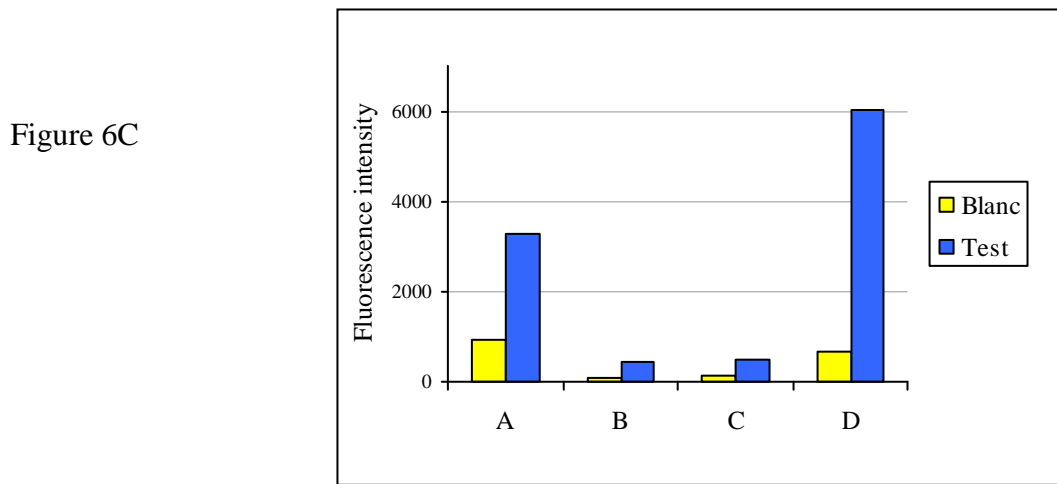
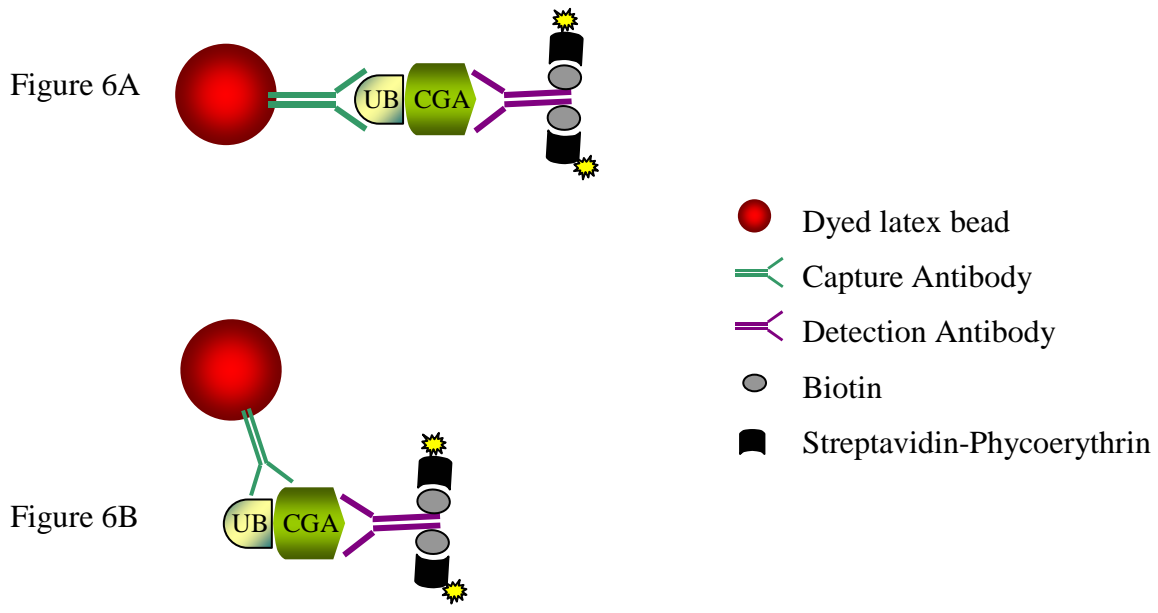
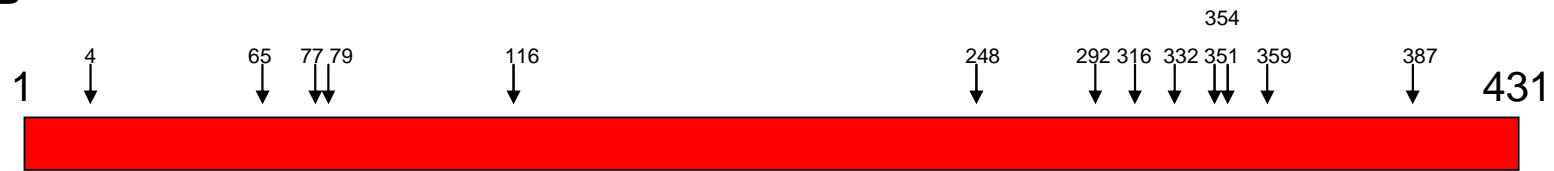


Figure 7

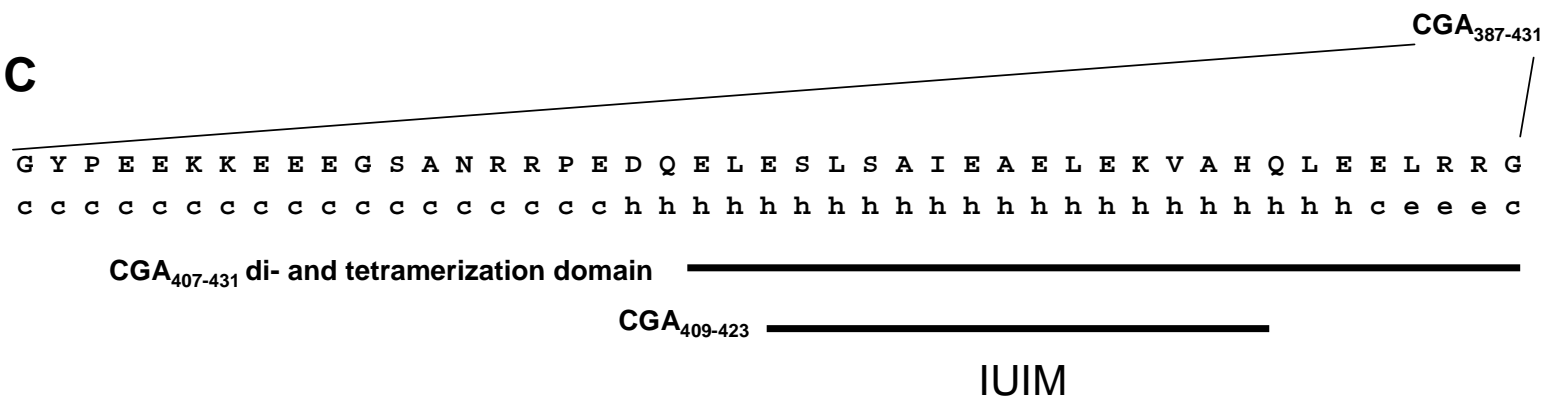
A

UIM	X a a a a h X X A X X X S X X a
bCGA (423-409)	H A V K E L - E A E I A S L S E
hCGA	H A V K E L - E A E I A S L S E
mCGA	H A V K E L - E A E I A S L S E
rCGA	H A V K E L - E A E I A S L S E
hHrs (258-273)	Q E E E E L Q L A L A L S Q S E
hS5a (282-297)	T E E E Q I A Y A M Q M S L Q G
hS5a (211-226)	S A D P E L A L A L R V S M E E

B



C



Bibliography

1. Lee S, Tsai YC, Mattera R, Smith WJ, Kostelansky MS, et al. (2006) Structural basis for ubiquitin recognition and autoubiquitination by Rabex-5. *Nat Struct Mol Biol* 13: 264-271.
2. Metz-Boutigue MH, Goumon Y, Lugardon K, Strub JM, Aunis D (1998) Antibacterial peptides are present in chromaffin cell secretory granules. *Cell Mol Neurobiol* 18: 249-266.
3. Wegrzyn J, Lee J, Neveu JM, Lane WS, Hook V (2007) Proteomics of neuroendocrine secretory vesicles reveal distinct functional systems for biosynthesis and exocytosis of peptide hormones and neurotransmitters. *J Proteome Res* 6: 1652-1665.
4. Strub JM, Goumon Y, Lugardon K, Capon C, Lopez M, et al. (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.
5. Strub JM, Sorokine O, Van Dorsselaer A, Aunis D, 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: 11928-11936.
6. Gasnier C, Lugardon K, Ruh O, Strub JM, Aunis D, et al. (2004) Characterization and location of post-translational modifications on chromogranin B from bovine adrenal medullary chromaffin granules. *Proteomics* 4: 1789-1801.
7. Goumon Y, Lugardon K, Gadroy P, Strub JM, Welters ID, et al. (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.
8. Kieffer AE, Goumon Y, Ruh O, Chasserot-Golaz S, Nullans G, et al. (2003) The N- and C-terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities. *Faseb J* 17: 776-778.
9. Yoshio H, Tollin M, Gudmundsson GH, Lagercrantz H, Jornvall H, et al. (2003) Antimicrobial polypeptides of human vernix caseosa and amniotic fluid: implications for newborn innate defense. *Pediatr Res* 53: 211-216.
10. Schlesinger DH, Goldstein G, Niall HD (1975) The complete amino acid sequence of ubiquitin, an adenylate cyclase stimulating polypeptide probably universal in living cells. *Biochemistry* 14: 2214-2218.
11. Schlesinger DH, Goldstein G (1975) Molecular conservation of 74 amino acid sequence of ubiquitin between cattle and man. *Nature* 255: 42304.
12. Hochstrasser M (1996) Protein degradation or regulation: Ub the judge. *Cell* 84: 813-815.
13. Doskeland AP, Flatmark T (2002) Ubiquitination of soluble and membrane-bound tyrosine hydroxylase and degradation of the soluble form. *Eur J Biochem* 269: 1561-1569.
14. Bader MF, Thierse D, Aunis D, Ahnert-Hilger G, Gratzl M (1986) Characterization of hormone and protein release from alpha-toxin-permeabilized chromaffin cells in primary culture. *J Biol Chem* 261: 5777-5783.
15. Ehrhart M, Grube D, Bader MF, Aunis D, Gratzl M (1986) Chromogranin A in the pancreatic islet: cellular and subcellular distribution. *J Histochem Cytochem* 34: 1673-1682.
16. Corti A, Longhi R, Gasparri A, Chen F, Pelagi M, et al. (1996) Antigenic regions of human chromogranin A and their topographic relationships with structural/functional domains. *Eur J Biochem* 235: 275-280.

17. Fujimuro M, Sawada H, Yokosawa H (1994) Production and characterization of monoclonal antibodies specific to multi-ubiquitin chains of polyubiquitinated proteins. *FEBS Lett* 349: 173-180.
18. Lugardon K, Raffner R, Goumon Y, Corti A, Delmas A, et al. (2000) Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A. *J Biol Chem* 275: 10745-10753.
19. Goumon Y, Angelone T, Schoentgen F, Chasserot-Golaz S, Almas B, et al. (2004) The hippocampal cholinergic neurostimulating peptide, the N-terminal fragment of the secreted phosphatidylethanolamine-binding protein, possesses a new biological activity on cardiac physiology. *J Biol Chem* 279: 13054-13064.
20. Metz-Boutigue MH, 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.
21. Hershko A, Ciechanover A, Varshavsky A (2000) Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nat Med* 6: 1073-1081.
22. Pickart CM (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70: 503-533.
23. Matsumoto M, Hatakeyama S, Oyamada K, Oda Y, Nishimura T, et al. (2005) Large-scale analysis of the human ubiquitin-related proteome. *Proteomics* 5: 4145-4151.
24. Vasilescu J, Smith JC, Ethier M, Figeys D (2005) Proteomic analysis of ubiquitinated proteins from human MCF-7 breast cancer cells by immunoaffinity purification and mass spectrometry. *J Proteome Res* 4: 2192-2200.
25. Takada K, Hirakawa T, Yokosawa H, Okawa Y, Taguchi H, et al. (2001) Isolation of ubiquitin-E2 (ubiquitin-conjugating enzyme) complexes from erythroleukaemia cells using immunoaffinity techniques. *Biochem J* 356: 199-206.
26. Peng J, Schwartz D, Elias JE, Thoreen CC, Cheng D, et al. (2003) A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat Biotechnol* 21: 921-926.
27. Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* 293: 1074-1080.
28. Schnell JD, Hicke L (2003) Non-traditional functions of ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *J Biol Chem* 278: 35857-35860.
29. Hofmann K, Falquet L (2001) A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems. *Trends Biochem Sci* 26: 347-350.
30. Polo S, Sigismund S, Faretta M, Guidi M, Capua MR, et al. (2002) A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins. *Nature* 416: 451-455.
31. Shih SC, Prag G, Francis SA, Sutanto MA, Hurley JH, et al. (2003) A ubiquitin-binding motif required for intramolecular monoubiquitylation, the CUE domain. *Embo J* 22: 1273-1281.
32. Klapisz E, Sorokina I, Lemeer S, Pijnenburg M, Verkleij AJ, et al. (2002) A ubiquitin-interacting motif (UIM) is essential for Eps15 and Eps15R ubiquitination. *J Biol Chem* 277: 30746-30753.
33. Oldham CE, Mohny RP, Miller SL, Hanes RN, O'Bryan JP (2002) The ubiquitin-interacting motifs target the endocytic adaptor protein epsin for ubiquitination. *Curr Biol* 12: 1112-1116.
34. Rotin D, Staub O, Haguenaer-Tsapis R (2000) Ubiquitination and endocytosis of plasma membrane proteins: role of Nedd4/Rsp5p family of ubiquitin-protein ligases. *J Membr Biol* 176: 1-17.
35. Shih SC, Sloper-Mould KE, Hicke L (2000) Monoubiquitin carries a novel internalization signal that is appended to activated receptors. *Embo J* 19: 187-198.

36. Haglund K, Sigismund S, Polo S, Szymkiewicz I, Di Fiore PP, et al. (2003) Multiple monoubiquitination of RTKs is sufficient for their endocytosis and degradation. *Nat Cell Biol* 5: 461-466.
37. Dunn R, Hicke L (2001) Multiple roles for Rsp5p-dependent ubiquitination at the internalization step of endocytosis. *J Biol Chem* 276: 25974-25981.
38. Fisher RD, Wang B, Alam SL, Higginson DS, Robinson H, et al. (2003) Structure and ubiquitin binding of the ubiquitin-interacting motif. *J Biol Chem* 278: 28976-28984.
39. Kang YK, Yoo SH (1997) Identification of the secretory vesicle membrane binding region of chromogranin A. *FEBS Lett* 404: 87-90.
40. Gadroy P, Stridsberg M, Capon C, Michalski JC, Strub JM, et al. (1998) Phosphorylation and O-glycosylation sites of human chromogranin A (CGA79-439) from urine of patients with carcinoid tumors. *J Biol Chem* 273: 34087-34097.
41. Guinez C, Mir AM, Dehennaut V, Cacan R, Harduin-Lepers A, et al. (2008) Protein ubiquitination is modulated by O-GlcNAc glycosylation. *Faseb J* 22: 2901-2911.
42. Barg S, Machado JD (2008) Compensatory endocytosis in chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf)* 192: 195-201.
43. Chan SA, Smith C (2001) Physiological stimuli evoke two forms of endocytosis in bovine chromaffin cells. *J Physiol* 537: 871-885.
44. Liao LW, Cole RD (1981) The amino acid sequence of residues 1-104 of CTL-1, a bovine H1 histone. *J Biol Chem* 256: 3024-3029.
45. Garnier J, Gibrat JF, Robson B (1996) GOR method for predicting protein secondary structure from amino acid sequence. *Methods Enzymol* 266: 540-553.

6.2 Introduction au manuscrit n°2

Staphylococcus aureus endoprotease Glu-C subverts innate immunity to reveal novel antimicrobial peptides derived from chromogranins (soumis à *Cellular Microbiology*)

Depuis plusieurs années notre équipe étudie les relations structure–fonction des peptides antimicrobiens sécrétés par les cellules chromaffines de la médullo–surrénale dans les états de stress. La signification biologique de ces peptides a été apportée par leur caractérisation dans les fluides biologiques impliqués dans les mécanismes de défense, tels que les sécrétions de neutrophiles polynucléaires (Goumon et al., 1996; Lugardon et al., 2000; Briolat et al., 2005). Ces peptides actifs contre les bactéries, champignons levures et parasite (*Plasmodium falciparum*) à une concentration de l'ordre du micromolaire ne sont pas toxiques pour l'hôte. Au cours d'une infection, ces peptides se trouvent en contact avec les facteurs de virulence des micro–organismes qu'ils sont capables de lyser. L'interaction entre ces deux types de molécules est au coeur de l'interaction moléculaire Hôte–Pathogène. Dans ce contexte, nous avons choisi d'étudier l'interaction de la protéase V8 (Glu–C) de *Staphylococcus aureus* avec les peptides antimicrobiens dérivés des chromogranines et sécrétés par les cellules chromaffines.

S. aureus est un pathogène responsable de nombreuses infections communautaires et nosocomiales, allant d'infections cutanées sans gravité jusqu'à de sévères pathologies incluant des pneumonies, arthrites... pouvant conduire jusqu'au choc septique qui présente un fort taux de mortalité. Par ailleurs, plus de 60 % des sujets sains sont infectés de façon transitoire ou permanente par *S. aureus* et les risques de complications sont fréquents chez les sujets immunodéprimés, les patients en cours de chimiothérapie et de traitements par voie intraveineuse. Au niveau bactériologique, l'émergence de souches résistantes à la Vancomycine indique un réel danger face à de nouvelles souches résistantes aux traitements antibiotiques classiques. Au cours de cette étude, nous avons incubé l'ensemble du matériel sécrété par les cellules chromaffines de la médullo–surrénale en présence de protéase Glu–C. L'étude a ensuite été menée au niveau structural et biologique. Du point de vue structural, nous avons chromatographié le matériel digéré par la protéase Glu–C et caractérisé les fragments obtenus. Du point de vue biologique, nous avons analysé les activités antibactériennes et antifongiques des fragments de chromogranines générés. Notre étude s'est focalisée sur les peptides dérivés de la maturation des chromogranines majoritaires les chromogranines A (CGA) et B (CGB).

Nous avons montré que sous l'effet de la protéase Glu–C, 18 nouveaux peptides antimicrobiens sont générés présentant essentiellement des activités antifongiques. Les peptides synthétiques correspondants ont été préparés et leurs spectres d'activités déterminés.

Nous avons ensuite synthétisé un peptide chimère composé du peptide chromogranine A (47–66 ; chromofungine) sur lequel a été branché le peptide C-terminal de l'ubi-

quitine (65–76). Il s'agit de 2 peptides antimicrobiens résultant de l'effet de la protéase Glu–C sur la chromogranine A et l'ubiquitine respectivement. Les propriétés antimicrobiennes de ce peptide chimère sont comparées à celles des deux peptides isolés.

En conclusion, il apparaît que *S. aureus* détourne l'activité antibactérienne des peptides naturels sécrétés par les cellules chromaffines stimulées pour générer de nouveaux peptides antifongiques. Ce résultat inattendu est discuté à la lumière des modifications post-traductionnelles portées par les chromogranines et les données bibliographiques récentes.

Staphylococcus aureus endoprotease Glu-C subverts innate immunity to reveal
novel antimicrobial peptides derived from chromogranins

Peiman Shooshtarizadeh¹, Aziza Akaddar², Bernard Guérold¹, Sylvie Perrotey^{2,5}, François Delalande¹, Dominique Bagnard¹, Ermanno Candolfi², Dominique Aunis¹, Youssef Haikel⁴, Gilles Prévost⁵, Marie-Hélène Metz-Boutigue^{1*}

¹ Inserm U575, Physiopathologie du Système Nerveux, 5 rue Blaise Pascal Strasbourg, France

² EA 3950, Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale, Université Louis Pasteur-Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 3 Rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France.

³ CNRS, UMR 7512, Laboratoire de Spectrométrie de Masse BioOrganique, Strasbourg, France

⁴ Faculté de chirurgie dentaire, 1 place de l'Hôpital, Strasbourg, France

⁵ EA 3432, Institut de Bactériologie, Université Louis Pasteur-Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 3 Rue Koeberlé, 67000 Strasbourg, France.

*Corresponding author : Marie-Hélène Metz-Boutigue

E-mail : metz@neurochem.u-strasbg.fr; Tel. (+33)3 88 45 66 09; Fax (+33)3 88 60 08 06.

Running title : *Staphylococcus aureus* endoprotease Glu-C generates novel antimicrobial peptides derived from chromogranins

Abstract

Staphylococcus aureus is a prominent Gram-positive bacterial pathogen responsible for numerous cases of infections, ranging from minor skin infections to life threatening diseases such as sepsis. Innate immunity with antimicrobial peptides represents an integrated and highly effective system of molecules and cellular mechanisms that defend the host against infection. The antimicrobial peptides avoidance mechanisms deployed by *Staphylococcus aureus* include proteolytic degradation. The aim of the present study is to evaluate the antimicrobial potency of the chromaffin cells secretory material in presence of *Staphylococcus aureus* Glu-C protease. For this (1) we determined the effect of the protease Glu-C on the processing of bovine CGA and CGB, (2) analyzed the antimicrobial activities of new generated peptides against bacteria, fungi, yeasts and *Plasmodium falciparum* and (3) showed the high conservation of these new antimicrobial peptides along evolution. Finally, we present for the first time that *Staphylococcus aureus* subverts innate immunity to degrade antibacterial peptides and produce new antifungal and anti-plasmodium agents.

Introduction

Staphylococcus aureus is a prominent Gram-positive bacterial pathogen responsible for numerous cases of community- and hospital-acquired infections, ranging from relatively minor skin and wound infections to life threatening diseases including toxic shock syndrome, pneumonia, arthritis, endocarditis, osteomyelitis and sepsis. Among the most severe complications, that have high morbidity and mortality, is the development of sepsis and septic shock associated with vascular damage and multiple organ failure [1]. Up to 60% of healthy individuals are permanently or transiently colonized by *S. aureus* and important risk factor for serious systemic and internal organ infections occur in patients with a suppressed immune system, undergoing surgery or with intravenous devices [2]. Furthermore, the emergence of strains with greatly reduced susceptibility to vancomycin indicates the danger of untreatable staphylococcal infections [3].

Innate immunity represents an integrated and highly effective system of molecules and cellular mechanisms that defend the host against infection. In addition to the physical barrier function of skin and mucosal epithelium, innate immunity is composed of soluble effectors such as cationic antimicrobial peptides (AMPs) and complement proteins. Recent discoveries using knockout mice have confirmed that cationic AMPs play a crucial role in restricting staphylococcal proliferation to skin and mucosal surfaces and in preventing spread to the deep tissues, where serious infection may develop [4]. However, relative resistance to efficient AMP killing is increasingly recognized as a discriminating feature of *S. aureus*. The AMPs avoidance mechanisms deployed by this pathogen include charge modifications of the cell membrane, proteolytic degradation, the AMP binding and inactivation activities of specific bacterial surface or secreted proteins [5]. In relation with the proteolytic degradation, it has been reported that the *S. aureus* metalloprotease aureolysin can cleave and inactivate human cathelicidin LL-37, thereby

contributing to the resistance of bacterium to innate immune clearance [6]. V8 protease (protease Glu-C) is another enzyme produced by *S. aureus* strain V8 to establish its virulence [7]. V8 protease is a serine endopeptidase which cleaves peptide bonds at the carboxyl side of Glu and Asp. It has been used repeatedly for structure-function studies of proteins.

Secretory granules from adrenal medullary chromaffin cells contain a complex mixture of molecules including catecholamines, low-molecular mass constituents and numerous water-soluble proteins and peptides, such as chromogranins (CGs), proenkephalin-A (PEA), ubiquitin (Ub), which are released in the circulation in response to splanchnic nerve stimulation [8]. During the past decade, our group has identified new antimicrobial peptides derived from chromogranin A (CGA) [9-11], chromogranin B (CGB) [12,13], PEA [14] and Ub [15] released with catecholamines by stimulated chromaffin cells during stress.

The aim of the present study is to evaluate the antimicrobial potency of the chromaffin cells secretory material in presence of protease Glu-C, a *S. aureus* virulence factor. For this, we have (1) determined the effect of the protease Glu-C on the processing of bovine CGA and CGB, (2) analysed the antimicrobial activities of the new generated peptides against bacteria, fungi, yeasts and *Plasmodium falciparum* and (3) showed the high conservation of these new antimicrobial peptides along evolution. Finally, we present for the first time that *S. aureus* subverts innate immunity to degrade antibacterial peptides and produce new antifungal and anti-plasmodium agents.

Experimental procedures

Preparation of intragranular matrix of chromaffin cells and digestion by endoprotease Glu-C

Soluble proteins from intragranular matrix of chromaffin secretory granules were isolated from bovine adrenal medulla as previously described [16]. This soluble material was digested for 18 h at 37°C by V8 protease (endoprotease 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.

Purification of CGs-derived peptides

The soluble intragranular matrix and the corresponding Glu-C protease digest were purified by HPLC on 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. Each peak fraction was collected manually and concentrated by evaporation, but not to dryness.

Peptide synthesis

All the synthetic peptides were prepared on an Applied Biosystems 433A peptide synthesizer (Foster City, USA), using the stepwise solid-phase approach with 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry. Then, the synthetic peptides were purified by RP-HPLC on a Macherey Nagel Nucleosil RP 300-7C18 column (10 × 250 mm; particle size 7 µm and pore size 100 nm). Rhodamine fluorophore 5(6)-carboxytetramethyl rhodamine was conjugated with peptides at the N-terminal extremity, as previously described [11]. Synthetic peptides were analyzed by mass spectrometry and automated Edman sequencing on an Applied Sequencing System (Applied

Biosystems, Foster City, USA) [16]. MALDI mass measurements were carried out on an Ultraflex™ TOF/TOF (Bruker Daltonics, USA) to perform a rapid control of synthetic peptides according to the procedure previously reported [17].

Mass spectrometry analysis

The RP-HPLC fractions proteins were digested with 40 µL of 12.5 ng/µL of modified porcine trypsin (Promega, Madison, WI, USA) in 25 mM NH₄HCO₃ at 37°C for 14 h. The generated peptides were analyzed directly by NanoLC-MS/MS on an Agilent 1100 Series HPLC-Chip/MS system (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) coupled to an HCT Ultra ion trap (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The voltage applied to the capillary cap was optimized to -1850 V. For tandem MS experiments, the system was operated with automatic switching between MS and MS/MS modes. The three most abundant peptides, preferring doubly charged ions, were selected on each MS spectrum for further isolation and fragmentation. The MS/MS scanning was performed in the ultrascan resolution mode at a scan rate of 26.000m/z per second. A total of 6 scans were averaged to obtain a MS/MS spectrum. The complete system was fully controlled by ChemStation (Agilent Technologies) and EsquireControl (Bruker Daltonics) software. Mass data collected during nanoLC-MS/MS analysis were processed before interpretation using a local Mascot™ (Matrix Science, London, UK) server. The searches were performed against the NCBI database [18].

Antibacterial activity

Bacteria were precultured aerobically at 37°C in a Mueller-Hinton-Broth medium (DifcoLaboratories, Detroit, MI), pH 7.3. The following bacteria strains were tested: *Micrococcus luteus* (A270), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Escherichia coli* (ATCC

25922). Bacteria were suspended in the Mueller-Hinton-Broth medium, and antibacterial activity was tested by measuring the inhibition of bacterial growth. Aqueous synthetic peptide solutions (10 µl) or HPLC fraction (20µl) 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. 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 assay

The following filamentous fungi strains were used: *Neurospora crassa* (CBS 327.54), and *Aspergillus fumigatus*. Spores at final concentration 10⁴ spores/ml were suspended in a growth medium containing Potato Dextrose Broth (Difco, Becton Dickinson Microbiology Systems) at half strength, supplemented with tetracycline (10 mg/ml) and cefotaxime (0.1 mg/ml). Aliquots of peptide (10 µl) were incubated in microtitre plates with 90 µl of fungal spore cultures. Fungal growth was assessed microscopically after an appropriate incubation period (24 or 48 h at 30°C). *Candida albicans* was used to evaluate the activity against Yeast cells. Preculture was carried out on a Sabouraud medium (24h at 30°C) and Yeast cell growth was assessed by the increase of absorbance at 620 nm.

Antiplasmodial activity against Plasmodium falciparum strains

We used 3D7 *P. falciparum* strain, an african strain sensitive to chloroquine. The strain was kindly provided by Professors Picot (EA 3732 Parasitologie, Mycologie Médicale et Pathologie Exotique, Faculté de Médecine, Université Claude Bernard, Lyon France) and Le Bras (EA 209

Centre National de Référence pour la Chimiosensibilité du Paludisme, APHP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Paris, France).

The strain was cultured with O-positive erythrocytes (EFS Strasbourg, France) in malaria culture medium (MCM) (supplemented with 10% Alpha Calf (Perbio Science, Brebières, France), as previously described [19,20]. An aqueous peptidic solution at concentration of 1 μ M was prepared as stock solution. Then, this stock solution was diluted in MCM at 10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 40 μ M, 50 μ M, 60 μ M and 100 μ M concentrations and tested for their antiparasitic activity at 48 h. The Minimal Inhibitory Concentration (MIC) is the concentration of peptide that maintained parasitemia at the baseline level (1 or 2%) from D0 to D4. The negative control corresponds to the unactive peptide CGA₄₋₁₆ (NSPMNKGDTVMK), tested in the same way on the chloroquine-sensitive strain 3D7 and found to be inactive in preliminary experiments (data not shown). Parasitemia was determined by lactate dehydrogenase (pLDH)-ELISA test[21]. pLDH, a specific intracellular metabolic enzyme from Plasmodium was measured using a commercial ELISA kit in whole blood (DiaMed ELISA Malaria Antigen test, Cressier sur Morat, Suisse) and following manufacturer recommendations.

Haemolytic activity assay

Normal RBCs (Red Blood Cells) were washed in sterile PBS (3 times). After each wash, the tube was centrifuged at 450g during 5 min at 4 °C, then PBS was added to reach a final haematocrit value of 2%. Peptide aqueous solution was prepared by diluting the peptides in sterile PBS from a stock solution of 1mM with series of 10 dilutions. Each peptide solution was added to RBCs suspension in 96 wells microplate, adding in each well 150 μ L of serial peptide solution to 150 μ L of RBCs suspension. The haemolytic assay was done in triplicate, using SDS 5% as

haemolytic agent (haemolysis control 100%), then the plate was incubated at 37 °C for 40 min with agitation, centrifuged at 400g during 5 min at 4 °C, followed by aspiration of supernatant and finally measuring the absorption at a wave length of 438nm. Haemolysis yield of each concentration was calculated as percentage by dividing the OD (optical density) obtained for each concentration on the OD obtained for positive control sample.

Time-lapse sequence videomicroscopy

To perform time-lapse videomicroscopy, fungi were embedded in a plasma clot and grown at the bottom of the Petri dishes. Cultures were maintained at 30°C in the chamber of the inverted microscope (Axiovert 200-Zeiss) equipped with a digital camera (Coolsnap fx; Roper Scientific). Images were taken every 30 min and movies were reconstructed using the metaview software (Universal Imaging). The growth of fungus was recorded for 2-6h to evaluate the normal growth of fungi in control conditions. The fluorescent peptides were directly added to the culture medium at a concentration of 0.1-1 µM and recording was performed during 2 to 6-h periods. To visualize the site of peptide incorporation, images were taken with both a phase contrast objective and appropriate fluorescent filters.

Results

Isolation of new antimicrobial chromogranins-derived peptides

Several antimicrobial peptides derived from chromogranins (CGA and CGB) were previously isolated and characterized [13,22]. Among these peptides some result from the natural processing of CGA [16] and CGB [12] (Table 1). These peptides are stored in secretory vesicles and secreted with catecholamines during stress. They display antibacterial activity against bacteria, fungi, yeasts. These peptides are active at the micromolar range (1.5 to 20 μ M) (table 1) and not toxic for the mammalian cells.

In the present study we decided to compare the antimicrobial activities of material present in intragranular matrix of bovine chromaffin cells, before and after digestion with *Staphylococcus aureus* protease Glu-C. The intragranular material (1 mg) was digested with protease Glu-C according to Experimental Procedures and chromatographed by HPLC. The chromatography was compared with that corresponding to the non-digested intragranular material (Figure 1A and B). An aliquot (1/4) of each fraction was tested against Gram positive bacteria (*Micrococcus luteus*), Gram negative bacteria (*Escherichia coli*), fungi (*Neurospora crassa*) and yeast (*Candida albicans*). The different fractions were inactive against bacteria and yeast but we detected 4 HPLC regions that display antifungal activity against *N. crassa*. In order to characterize these new antifungal peptides we analyzed by sequencing and MALDI-TOF mass analysis (Table 2) the fractions labelled A to J (Figure 1B). Among the 19 peptides, one corresponds to a new Catestatin containing fragment (fraction F, CGA334-378) and another to a Chromofungin derived peptide [10]. For each peptide, we reported the global net charge and the GRAVY index (Table 2). The localization of these new peptides is indicated in the complete sequences of CGA [23] and CGB [24] and compared with the natural peptides released by chromaffin cells before the Glu-C protease digestion (Figure 2 A and B).

Antimicrobial assays for 7 synthetic peptides

Then, we decided to prepare 7 synthetic peptides corresponding to the disulfide bridged peptide CGA14-20+38-40, to fragments CGA47-60, CGA418-427, CGB58-62, CGB279-291, CGB450-464 and CGB470-486. These peptides were tested against bacteria, fungi, yeasts, filamentous fungi and *Plasmodium falciparum*. Five peptides display antifungal activity with a MIC in the range 7-150 μ M and the fragment CGB58-62 displays an interesting antiplasmodial activity with a MIC of 0.9 μ M (Table 3A). We compared the sequence of each synthetic peptide with the corresponding sequences for several species (Table 3B). These alignments indicate that these peptides are highly conserved during evolution.

Secondary structure predictions of the active synthetic peptides

For each peptide the secondary structure prediction is obtained using the PSIPRED software (Figure 3). CGA47-60 corresponds to an amphipatic alpha helix according to our previous study [11], CGA 418-427, CGB279-291, CGB470-486 include a short helix in their core. CGB58-62 and CGB450-464 correspond to a strand structure and the larger peptide CGA334-378 is a combination of short helical structures, coil and strands (data not shown).

Antifungal activity of CGB450-464

To examine further the antifungal activity of CGB450-464, time-lapse videomicroscopy of developing fungi was performed in live conditions to follow the growth of hyphal tips of *N. crassa* with or without rhodaminated peptide in the culture medium (Figure 4). Rhodaminated CGB450-464 at 1 μ M was visible at the inner compartment after 5 min of incubation, indicating that CGB450-464 is able to rapidly and efficiently penetrate the cell wall (Figure 4). It is important to point out that the migration of the rhodaminated peptide was not complete into

fungi, suggesting that it was stopped by intracellular elements. In absence of peptide, filaments grow normally during the recording period (18 h) as shown by the extension and formation of filaments. In contrast, the peptide migration was stopped for the tips where the peptide was detected (Figure 4 time lapse video à completer). The fluorescent inactive peptide rhodaminated CGB 602-626 was used as negative control (data not shown).

Antiplasmodial activity of CGB58-62

The 7 synthetic peptides were tested against *Plasmodium falciparum* using the pLDH ELISA assay (Figure 5). Only, the peptide CGB58-62 was active, with a complete inhibition of the parasite growth at 5 μ M.

Discussion

With high yields of glutamic residues CGA (19%) and CGB (16.4%) these chromogranins are acidic proteins with a pI of 5.5. The two sequences are characterized by glutamic clusters (more than 2 glutamic residues): 13 for CGA corresponding to fragments 104-105, 146-147, 154-157, 207-211, 214-215, 225-227, 263-264, 280-283, 303-304, 335-340, 390-391, 394-395, 426-427 and 18 for CGB corresponding to fragments 51-52, 132-134, 149-150, 175-176, 204-205, 265-267, 277-278, 332-333, 356-357, 359-361, 423-424, 427-428, 448-449, 499-501, 526-527, 574-575, 586-588 and 597-600.

Involvement of the CGA and CGB primary structures on the Glu-C protease cleavage sites

Glu-C protease, a member of the glutamyl endopeptidase I family of *Staphylococcus aureus* V8 strain (GluV8) is widely used for proteome analysis because of its unique substrate specificity and resistance to detergents [7]. In CGA89-104 and CGB106-118, linkages E-P (CGA98-99 and CGB109-110) were not splitted, according to the properties of the Glu-C protease. Furthermore, in CGA274-283, CGA420-427, CGA245-264 and CGB279-291, the glutamic residues present at the C-terminal end were not cleaved indicating an incomplete degradation of these sequences. Interestingly, the glutamic acids cluster located at the N-terminal domain of Catestatin (CGA335-340) were not cleaved, allowing the formation of a new antifungal peptide containing Catestatin. The role of phosphorylated residues in the inhibition of the Glu-C protease is suggested with the absence of cleavage after E374 in CGA sequence (pS372 and pS376). In addition, the fragment CGB470-493 resulted to the cleavage at its C-terminal end of the bond D-pS suggesting a role the phosphotylated residue pS494 for the enzyme activity.

The natural antimicrobial peptides derived from CGA and CGB and the digestion by protease Glu-C from S. aureus.

The different antimicrobial peptides derived from CGA and CGB and identified in chromaffin granules were presented in Table 1. After Glu-C protease digestion of CGA, Vasostatin-I and prochromacin were degraded with the formation of antifungal peptides CGA47-60, CGA89-104, CGA245-264, CGA274-283 and the lost of the antibacterial activities. In contrast Catestatin was not degraded (CGA344-364) and a larger form CGA334-378 displays antifungal activity.

In parallel, after Glu-C protease digestion of CGB we have not identified new antibacterial antifungal peptides derived from the natural antimicrobial fragments BAM-1745, Chrombacin and Secretolytin.

All these new antifungal peptides were unable to display haemolytic activity.

Structure-activity relation of the synthetic peptides corresponding to the new antifungal peptides generated after Glu-C protease digestion

The secondary structures predictions of peptides CGA47-60, CGA418-426, CGB279-291 and CGB470-486 include helical central domain. In contrast, CGB58-62, the peptide that displays anti-plasmodial activity and CGB450-464 adopt a strand conformation (Figure 3).

Three synthetic peptides corresponding to the new antifungal peptides generated after Glu-C protease digestion possess a positive global charge (Table 2): CGA47-60 (+2), CGB279-291 (+1) and CGB450-464 (+3). In contrast, the charges of CGA418-426, CGB58-62 and CGB470-486 are evaluated to -1, 0 and 0 respectively.

It is important to point that fragments CGA47-60, CGA418-427, CGB 279-291 possess 1, 2 or 3 histidines highly conserved during evolution (Table 3 B). At a minor level, in some species CGB 450-464 and CGB4570-486 possess also histidine residues (Table 3B).

Importance of the histidine residues for the antimicrobial activities

The antimicrobial peptides form a large group (more than 1000 are currently known) of low molecular weight compounds (MW<10kDa) present in bacteria, plants, insects, amphibians up to humans [25]. They serve as antibacterial, antifungal and antiviral agents and play an important role in innate host defense. The molecules are amphipathic and often cationic with arginine and lysine residues [25]. They can be divided into various classes including linear peptides, peptides containing disulfide bridges and peptides rich in specific aminoacids such as histidine, glycine and proline [26]. Histatins is a class of histidine-rich antimicrobial peptides occurring in human saliva. Demegen P-113, a 12 aminoacid fragment of Histatin-5 is the smallest fragment of these peptides family that reveals antimicrobial activity [27]. The biological relevance of the metal binding with histatins has been proven and it has the influence on antifungal and antibacterial mechanism of the protein [28,29]. The presence of histidyl and other residues with potential metal binding abilities makes demegen an attractive ligand for Cu²⁺ [30]. In addition, it was demonstrated that the dipeptide with the two histidyl residues was crucial for complex formation with metal in the 4.5-7 pH range [30].

Thus a possible mechanism for the new antifungal CGA and CGB derived peptides may be the microorganism growth inhibition *via* the binding of metal crucial for the pathogen. Furthermore, aggregation and membrane permeabilizing properties of designed histidine-containing cationic linear peptides were reported [31]. The central core of these sequences are composed of leucines, alanines and four histidines and consequently the peptides were named LAH4 [32]. These peptides have enhanced membrane disruption and antibiotic properties when the peptide adopts an alignment parallel to the membrane surface.

*Resistance of antimicrobial histidine-containing peptides to *Staphylococcus aureus* protease*

We note that glutamic residues present in synthetic active peptides CGA418-427 and CGA279-291 were not recognized by the endoprotease Glu-C from *Staphylococcus aureus*. This enzymatic resistance may be attributed to a restricted enzymatic accessibility resulting to the local rigidity of the helical peptide structure [33].

Conclusions of the subversion of innate immunity by Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus is a common commensal of humans and cause illnesses ranging from superficial skin infections to serious invasive infections such as septic arthritis, osteomyelitis and endocarditis. The broad spectrum of diseases caused by *Staphylococcus aureus* reflects not only an ability to colonize different tissues through an array of surface-bound adhesions but also to circumvent various immune surveillance systems. For the first time, the present study demonstrates that the *Staphylococcus aureus* protease Glu-C prevents the antibacterial activities of the chromogranin-derived peptides released by chromaffin cells and neutrophils to produce new antifungal and antiplasmodial peptides.

Acknowledgements

This work was funded by Inserm and the Université Louis Pasteur (Strasbourg, France) and supported by the Faculté of Odontologie (pHD grant for PS). We are indebted to Dr Andreas Bergmann for interesting discussions and the financial support of BRAHMS (pHD grant for PS). We thank Nadège A. Pfender for the excellent preparation of the disulfide bridged peptide CGA14-20+38-40 (UMR 7177, CNRS- Université Louis Pasteur (Strasbourg, France)).

Legends of Figures

Figure 1. Separation by HPLC (A) of bovine chromaffin intragranular matrix (1 mg) and (B) of protease Glu-C digest of bovine chromaffin intragranular matrix (1 mg).

HPLC was performed on a macherey nagel Lichrospher 100-5-RP-C18 column (4 x 250 mm; particle size 5 µm and pore size 100 nm). The solvent system consisted of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in water (solvent A) and 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in 70% (v/v) acetonitrile and 30% (v/v) water (solvent B). Absorbance was monitored at 214 nm and elution was performed with a linear gradient as indicated on the right-hand scale. The antibacterial and antifungal activities of each fraction was evaluated according to the reported Experimental procedure. In blue, active against *Neurospora crassa*, in green, active against *Aspergillus fumigatus*, in orange, active against *Micrococcus luteus* and in yellow, active against *Candida albicans*. After Glu-C protease digestion fractions active against *Neurospora crassa* are indicated A to J.

Figure 2. Localisation in the CGA (A) and CGB (B) sequences of the antifungal peptides generated after Glu-C protease digestion (grey highlighted). For each protein the posttranslational modifications are indicated : P, phosphorylation; G, O-glycosylation; G, N-glycosylation; S, sulfatation. Black arrows indicate cleavage sites occurring during endogenous processing and black vertical lines the sites identified after Glu-C protease digestion. The antimicrobial peptides previously characterized are indicated.

Figure 3. Secondary structure predictions of the new synthetic antimicrobial peptides according to PSIPRED program.

Figure 4. Time-lapse videomicroscopy analysis of *N. crassa* growth in the presence of rhodaminated CGB450-464. A compléter avec le film.

Figure 5. Antiplasmodial activity of CGB58-62 measured by pLDH-ELISA assay.

Table 1: Antimicrobial activities of bovine CGA- and CGB-derived peptides (MIC)

A

Microorganisms	CGA-derived peptide							CGB-derived peptide		
	1-76*	47-70	79-431*	173-194 (P)	173-194 (G)	173-194 (PG)	344-358	547-561*	564-626*	614-626*
<i>Micrococcus luteus</i>	2	—	1.5	1.5	1.5	1.5	2	10	1.8	2.7
<i>Escherichia coli</i>	—	—	—	—	—	—	15	—	—	—
<i>Candida albicans</i>	10	—	ND	ND	ND	ND	8	—	ND	—
<i>Neurospora crassa</i>	3	5	ND	ND	ND	ND	3.2	—	ND	—
<i>Plasmodium falciparum</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	20	ND	ND	ND

MIC, minimal concentration completely inhibiting microorganism; *natural antimicrobial peptide; — not detectable activity; ND, Not Determined; P, phosphorylated form; G O-glycosylated form.

Antimicrobial CGA-derived peptides

1-76 : Vasostatin-I

47-70 : Peptide containing Chromofungin (47-66)

79-431 : Prochromacin

173-194 : Chromacin

344-358 : Cateslytin, the active fragment of Catestatin (344-364)

Antimicrobial CGB-derived peptides

547-561 : BAM-1745

564-626 : Chrombacin or CGB C-terminal peptide (CCB)

614-626 : Secretolytin

Table 2: Characterization of peptides present in HPLC fractions (A to J) displaying antifungal activity against *Neurospora crassa*.

HPLC fraction	Identified peptides	Net charge	† GRAVY index
A	• CGA V ₁₄ MKCIVE ₂₀	0	1.414
	• CGB N ₅₈ TRFE ₆₂	0	-1.88
	• CGB R ₁₀₆ AGEPPGSQVAKE ₁₁₈	0	-1.223
B	• CGA W ₂₇₄ AHSRQEEEE ₂₈₃	-3	-2.510
	• CGA K ₄₂₀ VAHQLEE ₄₂₇	-1	-0.975
C	• CGB A ₄₅₀ RLRGKQYAPHHITE ₄₆₄	+3	-1.227
D	• CGA V ₁₄ MKCIVE ₂₀ -C ₃₈ FE ₄₀	-1	1.170
	• CGA L ₆₁ QDLALQGAKE ₇₁	-1	-0.300
	• CGA T ₂₄₅ QRAAPGWPE ₂₅₄	0	-1.310
E	• CGA L ₆₄ ALQGAKE ₇₁	0	-0.013
	• CGB K ₂₇₉ ARHPAHFRALEE ₂₉₁	+1	-1.223
F	• CGA* G ₃₃₄ EEEEEDPDRSM.....DSVE ₃₇₈	-2	-1.638
G	• CGA** R ₄₇ ILSILRHQNLLKE ₆₀	+2	-0.229
H	• CGB L ₄₇₀ LNPFYDPSQWKSSRFERKDPMD ₄₉₃	-1	-1.483
I	• CGB L ₄₇₀ LNPFYDPSQWKSSRFE ₄₈₆	0	-1.000
J	• CGA V ₈₉ LEKPNDQAEPEVTE ₁₀₄	-3	-1.387
	• CGA T ₂₄₅ QRAAPGWPE ₂₆₄ DGAGKMGAE	-2	-1.160
	• CGA A ₃₇₉ GLPLQVRGYPE ₃₉₀	0	-0.267
	• CGA L ₄₁₈ EKVAHQLE ₄₂₆	-1	-0.444

† Gravy: Grand average of hydrophobicity

* Catestatin containing peptide

** Chromofungin derived peptide

Table 3: New antimicrobial synthetic peptides (MIC) and sequence alignment; Conserved Histidine residues are grey highlighted

A

Microorganism	CGA –derived peptide			CGB-derived peptide			
	14-20+38-40	47-60*	418-427	58-62	279-291	450-564	470-486
<i>Micrococcus luteus</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>Escherichia coli</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>Candida albicans</i>	—	—	—	—	—	—	—
<i>Neurospora crassa</i>	—	7 µM	50 µM	—	20 µM	20 µM	150 µM
<i>Plasmodium falciparum</i>	—	—	—	0.9 µM	—	—	—

—, not detectable activity; *according to Lugardon et al., 2000; MIC, minimal concentration completely inhibiting microorganism.

B

CGA₄₇₋₆₀

bCGA RILSILRHQ**HL**LLKE
hCGA RILSILRHQ**HL**LLKE
pCGA RILSILRHQ**HL**LLKE
rCGA RVLSILRHQ**HL**LLKE
mCGA RILSILRHQ**HL**LLKE
eCGA RILSILRHQ**HL**LLKE
oCGA RIILSIRHQ**HL**LLKE
fCGA RIILSIRHQ**HL**LLKE

CGA₄₁₈₋₄₂₇

bCGA LEKVAHQ**LE**E
hCGA LEKVAHQ**L**QA
pCGA LEKVAP**Q**LQS
rCGA LEKVAHQ**L**QA
mCGA LEKVAHQ**L**QA
eCGA LEKVAHQ**L**QA

CGB₅₈₋₆₂

bCGB NTR**F**E
hCGB NTK**F**E
pCGB NTR**F**E
rCGB NSK**F**E
mCGB NSK**F**E

CGB₂₇₉₋₂₉₁

bCGB KARHPAH**F**RALEE
hCGB RDH**H**STHYRASEE
pCGB RTRHP**T**HYRASEE
rCGB RGH**H**LAHYRASEE
mCGB RSH**H**LAHYRASEE

CGB₄₅₀₋₄₆₄

bCGB ARLRGKQYAP**HH**ITE
hCGB ARFQDKQYSS**HH**TAE
pCGB ARLPGKPYAA**H**RIPE
rCGB VSF**P**DRQYAPYPTTE
mCGB VRF**P**DRQYEPYPITE

CGB₄₇₀₋₄₈₆

bCGB LLNPFYDPSQWKSS**R**FE
hCGB LFN**P**YYDPLQWKSS**H**FE
pCGB LLN**P**YYVPPQWESS**H**FE
rCGB LFN**P**YFDPLQWKNSD**F**E
mCGB LFN**P**YFDPLQWKNSD**F**E

Figure 1

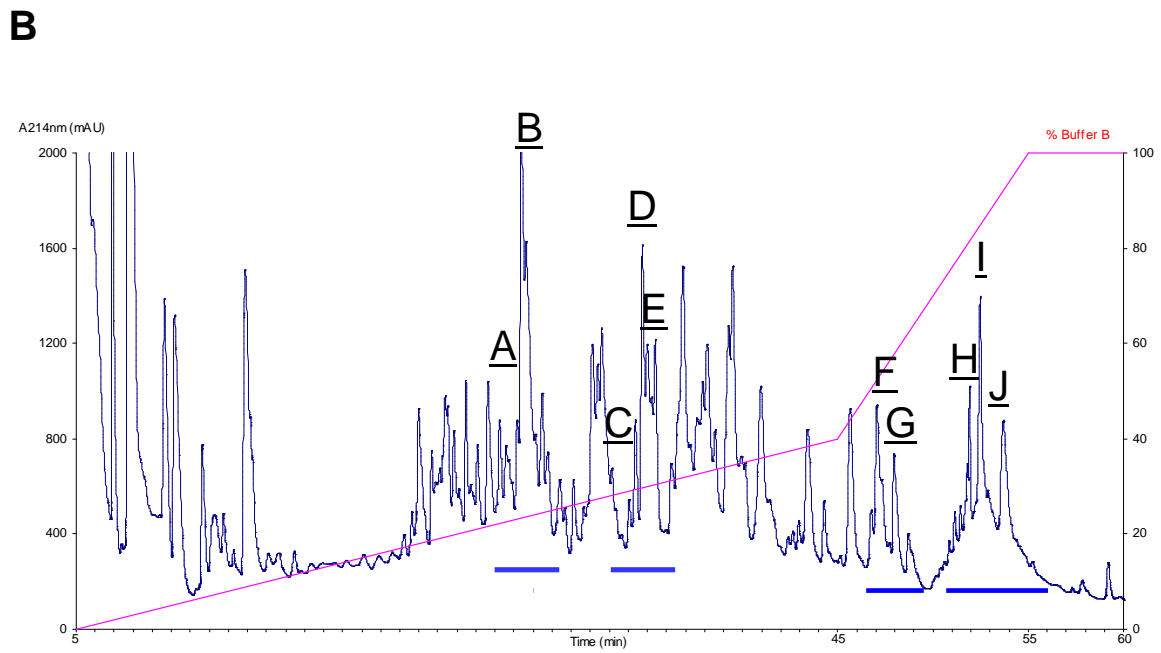
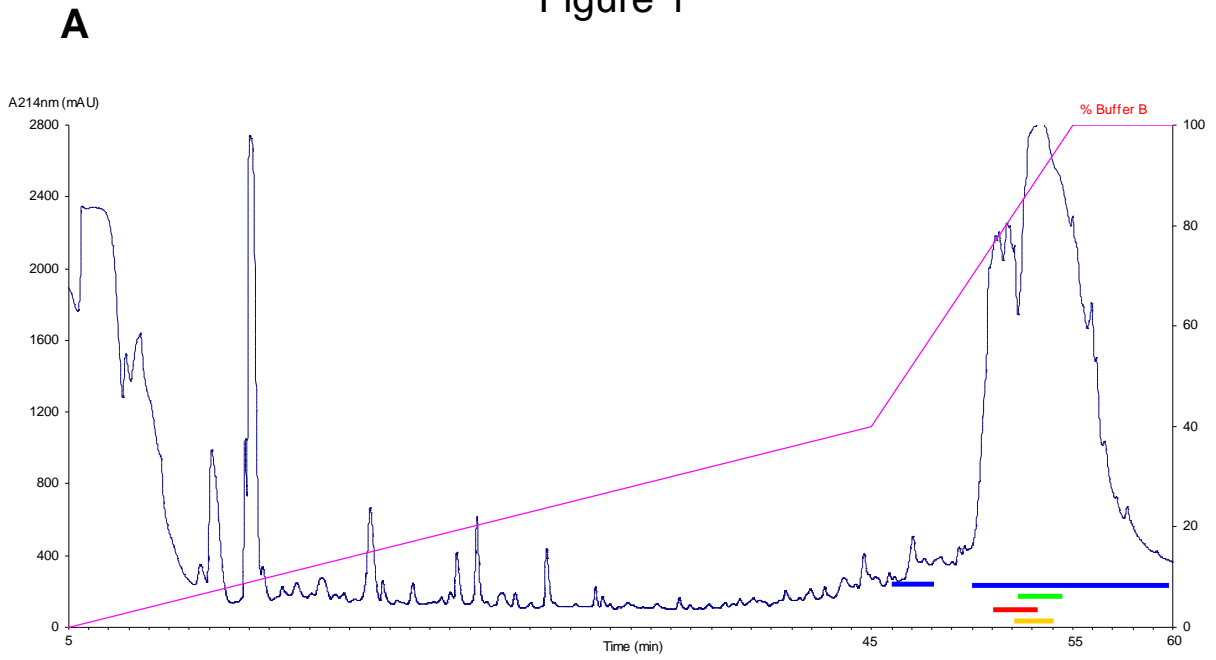


Figure 2

A

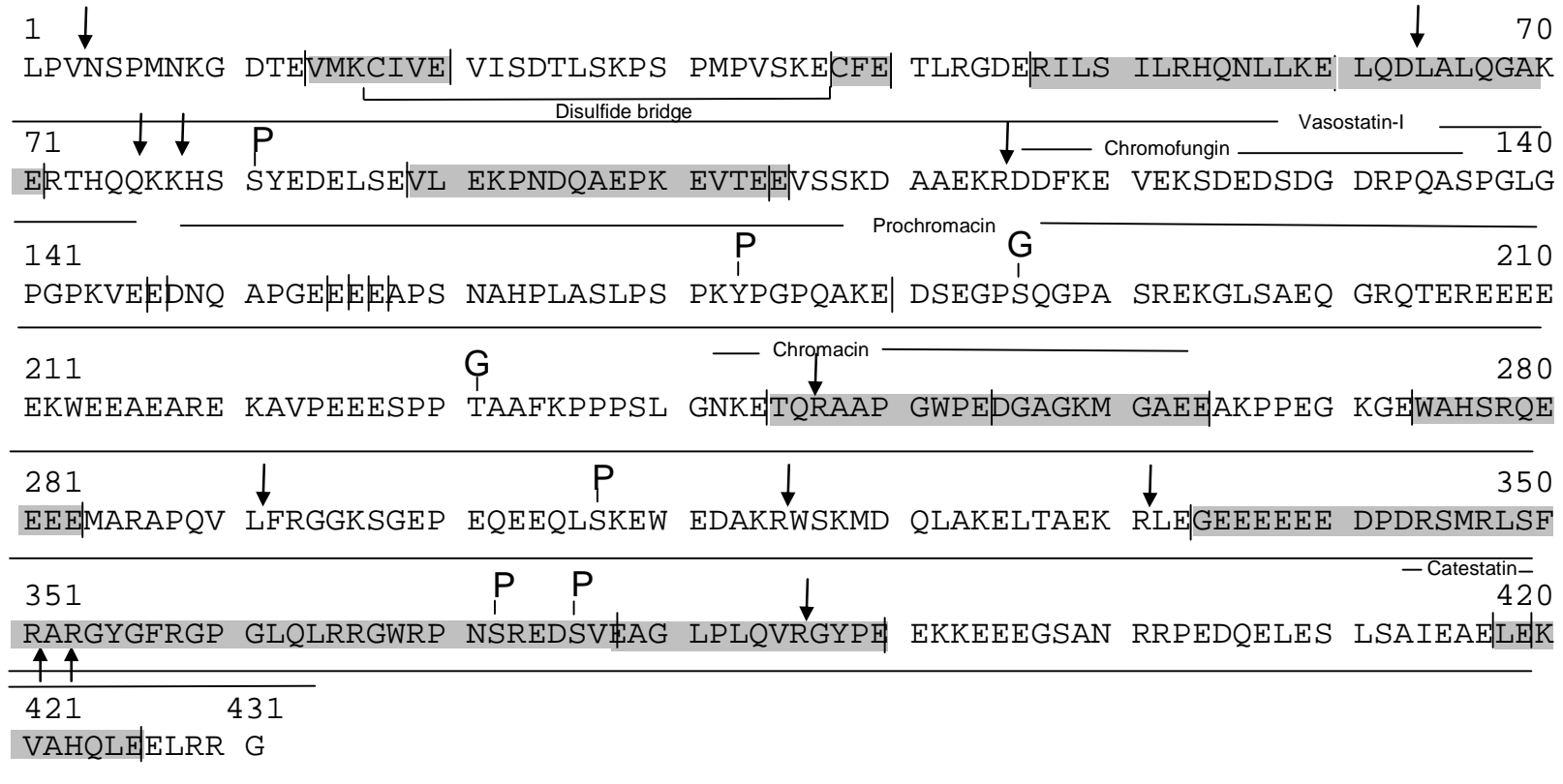


Figure 2

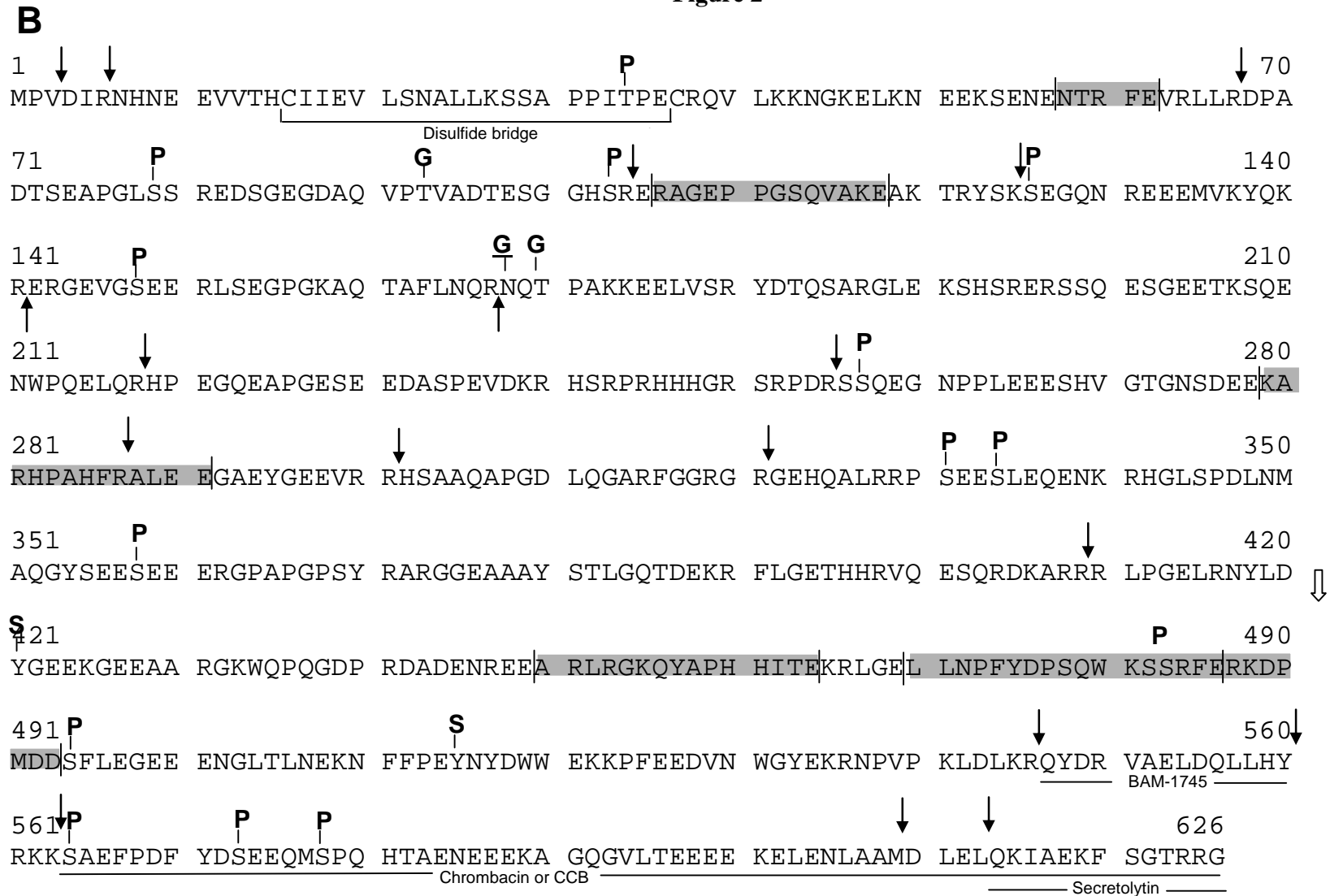
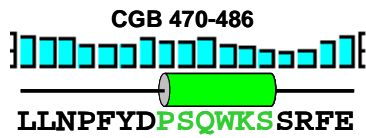
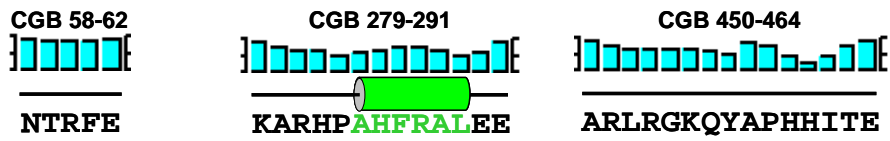


Figure 3

A



B



} . . . | | { Confidence of prediction
- +

Helix

Strand

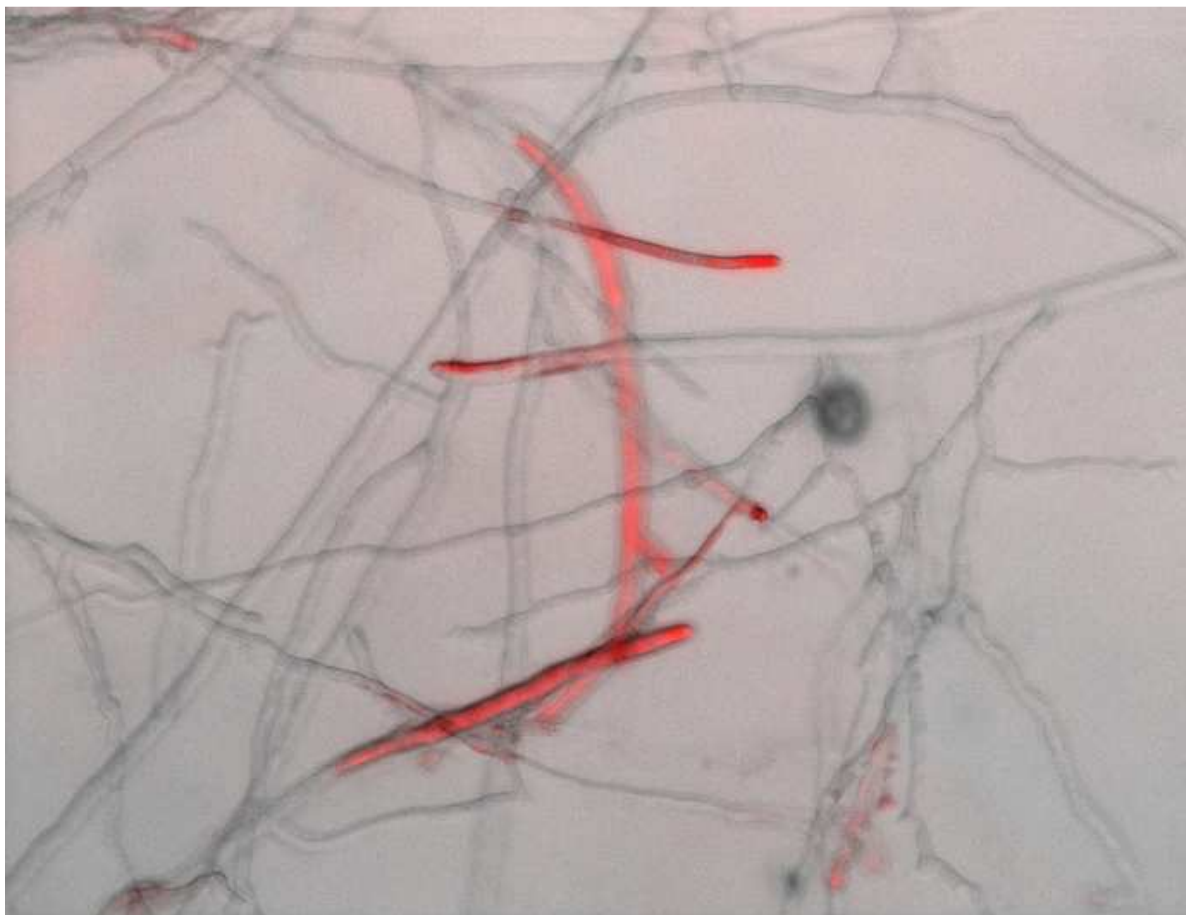


Figure 4

Bibliography

1. Lowy FD (1998) Staphylococcus aureus infections. *N Engl J Med* 339: 520-532.
2. Kluytmans J, van Belkum A, Verbrugh H (1997) Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin Microbiol Rev* 10: 505-520.
3. Walsh TR, Howe RA (2002) The prevalence and mechanisms of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus. *Annu Rev Microbiol* 56: 657-675.
4. Morrison G, Kilanowski F, Davidson D, Dorin J (2002) Characterization of the mouse beta defensin 1, Defb1, mutant mouse model. *Infect Immun* 70: 3053-3060.
5. Nizet V (2007) Understanding how leading bacterial pathogens subvert innate immunity to reveal novel therapeutic targets. *J Allergy Clin Immunol* 120: 13-22.
6. Sieprawska-Lupa M, Mydel P, Krawczyk K, Wojcik K, Puklo M, et al. (2004) Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by Staphylococcus aureus-derived proteinases. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 4673-4679.
7. Houmard J, Drapeau GR (1972) Staphylococcal protease: a proteolytic enzyme specific for glutamoyl bonds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69: 3506-3509.
8. Metz-Boutigue MH, Kieffer AE, Goumon Y, Aunis D (2003) Innate immunity: involvement of new neuropeptides. *Trends Microbiol* 11: 585-592.
9. Strub JM, Goumon Y, Lugardon K, Capon C, Lopez M, et al. (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.
10. Lugardon K, Raffner R, Goumon Y, Corti A, Delmas A, et al. (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 AE, Maget-Dana R, Nullans G, et al. (2001) Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A-(47-66)-derived peptide. *J Biol Chem* 276: 35875-35882.
12. Strub JM, Garcia-Sablone P, Lonning K, Taupenot L, Hubert P, et al. (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.
13. Metz-Boutigue MH, Goumon Y, Lugardon K, Strub JM, Aunis D (1998) Antibacterial peptides are present in chromaffin cell secretory granules. *Cell Mol Neurobiol* 18: 249-266.
14. Goumon Y, Strub JM, Moniatte M, Nullans G, Poteur L, et al. (1996) The C-terminal bisphosphorylated proenkephalin-A-(209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity. *Eur J Biochem* 235: 516-525.
15. Kieffer AE, Goumon Y, Ruh O, Chasserot-Golaz S, Nullans G, et al. (2003) The N- and C-terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities. *Faseb J* 17: 776-778.
16. Metz-Boutigue MH, 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.
17. Gevaert K, Vandekerckhove J (2000) Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis* 21: 1145-1154.

18. Delalande F, Carapito C, Brizard JP, Brugidou C, Van Dorsselaer A (2005) Multigenic families and proteomics: extended protein characterization as a tool for paralog gene identification. *Proteomics* 5: 450-460.
19. Trager W, Jensen JB (1997) Continuous culture of *Plasmodium falciparum*: its impact on malaria research. *Int J Parasitol* 27: 989-1006.
20. Schuster FL (2002) Cultivation of *plasmodium* spp. *Clin Microbiol Rev* 15: 355-364.
21. Kaddouri H, Nakache S, Houze S, Mentre F, Le Bras J (2006) Assessment of the drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* clinical isolates from africa by using a *Plasmodium* lactate dehydrogenase immunodetection assay and an inhibitory maximum effect model for precise measurement of the 50-percent inhibitory concentration. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 3343-3349.
22. Briolat J, Wu SD, Mahata SK, Gonthier B, Bagnard D, et al. (2005) New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin A. *Cell Mol Life Sci* 62: 377-385.
23. Iacangelo A, Affolter HU, Eiden LE, Herbert E, Grimes M (1986) Bovine chromogranin A sequence and distribution of its messenger RNA in endocrine tissues. *Nature* 323: 82-86.
24. Bauer JW, Fischer-Colbrie R (1991) Primary structure of bovine chromogranin B deduced from cDNA sequence. *Biochim Biophys Acta* 1089: 124-126.
25. Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415: 389-395.
26. Hancock RE (1997) Peptide antibiotics. *Lancet* 349: 418-422.
27. Rothstein DM, Spacciapoli P, Tran LT, Xu T, Roberts FD, et al. (2001) Anticandida activity is retained in P-113, a 12-amino-acid fragment of histatin 5. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 1367-1373.
28. Grogan J, McKnight CJ, Troxler RF, Oppenheim FG (2001) Zinc and copper bind to unique sites of histatin 5. *FEBS Lett* 491: 76-80.
29. Gusman H, Lendenmann U, Grogan J, Troxler RF, Oppenheim FG (2001) Is salivary histatin 5 a metallopeptide? *Biochim Biophys Acta* 1545: 86-95.
30. Kulon K, Valensin D, Kamysz W, Valensin G, Nadolski P, et al. (2008) The His-His sequence of the antimicrobial peptide demegen P-113 makes it very attractive ligand for Cu²⁺. *J Inorg Biochem* 102: 960-972.
31. Marquette A, Mason AJ, Bechinger B (2008) Aggregation and membrane permeabilizing properties of designed histidine-containing cationic linear peptide antibiotics. *J Pept Sci* 14: 488-495.
32. Bechinger B (1996) Towards membrane protein design: pH-sensitive topology of histidine-containing polypeptides. *J Mol Biol* 263: 768-775.
33. Kim YJ, Kim YA, Park N, Son HS, Kim KS, et al. (2005) Structural characterization of the molten globule state of apomyoglobin by limited proteolysis and HPLC-mass spectrometry. *Biochemistry* 44: 7490-7496.

Conclusions et perspectives

7 Conclusions et perspectives

Depuis une dizaine d'années, notre équipe est impliquée dans l'analyse de la maturation et des modifications post-traductionnelles des chromogranines. Les modifications post-traductionnelles sont le reflet d'un état physiologique, d'un type cellulaire ou d'une pathologie. Dans ce contexte, il est important de caractériser leur incidence sur l'activité des peptides dérivés sécrétés, dans les états de stress survenant au cours d'états pathologiques.

L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle de protéines résultant d'un mécanisme de cascades enzymatiques, découverte au cours des années 1980 par Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose, ce qui leur a valu l'obtention du prix Nobel de Chimie en 2004. Cette modification aboutit à la liaison covalente d'une ou plusieurs molécules d'ubiquitine sur une lysine acceptrice du substrat. En 2003, notre équipe a montré que l'ubiquitine est sécrétée par les cellules chromaffines stimulées et possède des activités antimicrobiennes (Kieffer et al., 2003) qui ont été par la suite confirmées par une autre équipe (Yoshio et al., 2003). De plus, la présence de tyrosine hydroxylase ubiquitinée a été montrée au niveau de la membrane des granules chromaffines (Døskeland et Flatmark, 2002). Ces résultats suggèrent la présence de la machinerie d'ubiquitination au niveau des granules chromaffines.

Pendant ma thèse, je suis arrivé à démontrer la présence du premier enzyme de la voie d'ubiquitination, l'*ubiquitin-activating enzyme* (E1) au niveau de la matrice et de la membrane des granules chromaffines. La présence de cette enzyme suggère que l'ubiquitination est une modification post-traductionnelle présente au niveau de ces deux fractions subcellulaires. Par la suite, nous avons cherché à répondre à la question suivante : la CGA joue-t-elle un rôle dans la machinerie d'ubiquitination au niveau de la membrane des granules chromaffines ?

Notre étude a porté sur la membrane des granules chromaffine car les résultats des analyses de western blot indiquaient la présence d'une grande quantité de protéines ubiquitinées dans ces membranes. L'association de l'ubiquitine avec la CGA a été démontrée par la technique Bio-Plex qui s'est avérée plus efficace que l'analyse par spectrométrie de masse. C'est la première fois que cette technique est utilisée pour la caractérisation de protéines ubiquitinées. Cependant, on ne peut pas exclure l'hypothèse d'une ubiquitination sur un autre résidu que la lysine, qui est impossible à identifier par

comparaison avec les banques de données utilisées (Cadwell et Coscoy, 2005).

Pour la première fois nous avons montré que la CGA possède un site de reconnaissance à l'ubiquitine très conservé au cours de l'évolution, structuré en hélice alpha et participant à la polymérisation de la CGA. Ce site appartient à la famille *Ubiquitine Interacting Motif* (UIM) et suggère que la CGA participe à la machinerie d'ubiquitination présente sur la membrane des granules chromaffines.

Il a été démontré qu'il est potentiellement possible d'ubiquitiner certains résidus sérine et thréonine (Cadwell et Coscoy, 2005). On peut imaginer aussi une association entre l'ubiquitine et la CGA par intermédiaire d'une troisième protéine, une *protéine entremetteuse*, qui conduirait à la formation d'un complexe protéique non décryptable par une analyse directe en spectrométrie.

L'association de la CGA avec la forme mutée de la superoxyde dismutase (SOD1) a été démontrée dans le cas de la sclérose latérale amyotrophique ou SLA (Urushitani et al., 2006). La SOD1 mutée peut se lier simultanément à la CGA et à l'ubiquitine pour être finalement adressée au protéasome.

Parmi les nombreuses fonctions de l'ubiquitine, la plus étudiée concerne l'adressage des protéines vers la voie du protéasome (un complexe enzymatique multiprotéique) pour la dégradation. Malgré le fait que pendant cette étude, toutes les mesures aient été prises pour inhiber les activités protéolytiques, il est possible que la CGA ubiquitinée néanmoins soit dégradée par le protéasome, ce qui empêche sa caractérisation par l'approche protéomique. Pour cette raison, l'utilisation d'inhibiteur spécifique du protéasome comme l'époxomicine au cours de la préparation des échantillons à partir de glande surrénale peut être utile. Par ailleurs, on peut envisager l'approche BioPlex après l'utilisation d'enzymes de déubiquitination. Dans ce cas, la perte du signal démontrerait la présence d'une liaison isopeptidique entre l'ubiquitine et la CGA.

En conclusion de cette première partie de ma thèse, une question s'impose : quel est le rôle biologique de l'ubiquitination de la CGA ?

Grâce aux études réalisées par notre équipe pendant plusieurs années, on sait maintenant que les chromogranines et leurs peptides dérivés jouent un rôle important dans l'immunité innée en tant que PAMs et immunomodulateurs. Ainsi depuis plusieurs années notre équipe s'intéresse aux PAMs dérivés des chromogranines, marqueurs de l'inflammation. Les granules de sécrétion des cellules chromaffines possèdent une batterie des PAMs dérivés des chromogranines mais aussi d'autres protéines présentes au sein de ces granules, telles que la proenképhaline A et l'ubiquitine. On a montré la possibilité d'une action synergique entre ces PAMs, permettant une réponse immunitaire plus efficace.

Dans ce contexte, un peptide hybride (nommé ubigranine) constitué d'un peptide antimicrobien dérivé de la CGA (chromofungine ; CGA₄₇₋₆₆) et du fragment C-terminal de l'ubiquitine (ubifungine ; Ub₆₅₋₇₆) lié du façon covalente sur un résidu de lysine de la chromofungine a été élaboré en attendant de pouvoir étudier le rôle de la CGA ubiquitinée dans l'immunité. L'ubigranine possède une activité antimicrobienne et une

stabilité plus forte, comparée aux deux peptides pris séparément. Ces deux peptides ont été obtenus sous l'effet de la protéase Glu-C de *Staphylococcus aureus* qui est un des facteurs de virulence libéré par la bactérie au cours de l'infection. L'émergence de pathogènes microbiens, résistants aux thérapies antibiotiques conventionnelles, requiert aujourd'hui la découverte de nouvelles molécules actives et non toxiques. Cette dernière décennie a vu s'accroître les connaissances sur les peptides antimicrobiens naturels qui se profilent comme des candidats potentiels.

Dans la deuxième partie de ma thèse on a cherché à caractériser tous les PAMs dérivés de la CGA sous l'action de la protéase Glu-C. La plupart de ces peptides appartiennent à la famille des *Histidine-Rich-Peptides*, qui sont utilisés pour des expériences de *Drug Design*. Ce résultat nous interpelle : le pathogène agit-il sur l'immunité innée par un effet subversif pour faciliter son développement et détruire les autres espèces pathogènes concurrentes, par exemple les champignons ?

Pour répondre à cette nouvelle question des expériences complémentaires sont nécessaires mettant en jeu des modèles animaux infectés et l'analyse de leurs fluides biologiques.

Liste des Publications

8 Liste des publications

1. **Peiman Shooshtarizadeh**, Jaroslava Ciesielski-Treska, Thomas Lavaux, François Delalande, Daniel Keller, Alain van Dorsselaer, Youssef Haïkel, Dominique Aunis, Francis Schneider Gilles Prévost, Marie-Hélène Metz-Boutigue. Ubiquitination machinery at the membrane level of bovine chromaffin secretory vesicles : a new role for CGA ? (Soumis à publication)
2. **Peiman Shooshtarizadeh**, Aziza Akadar, Bernard Guérold, Sylvie Perrotey, François Delalande, Dominique Bagnard, Ermanno Candolfi, Dominique Aunis, Youssef Haïkel, Gilles Prévost, Marie-Hélène Metz-Boutigue. *Staphylococcus aureus* endoprotease Glu-C subverts innate immunity to reveal novel antimicrobial peptides derived from chromogranins. (Soumis à publication)
3. Marie-Hélène Metz-Boutigue, **Peiman Shooshtarizadeh**, Gilles Prevost, Jean-François Chich. Innate immunity and natural peptides in mammals. *Current Pharmaceutical Design* (revue invitée, en cours de rédaction)
4. Zhang Dan, **Shooshtarizadeh Peiman**, Laventie Benoît, Colin Didier André, de Barry Jean, Chasserot-Golaz Sylvette, Delalande François, Schneider Francis, Helle Karen, Aunis Dominique, Prévost Gilles, Metz-Boutigue Marie-Hélène. Two peptides of chromogranin A induce calcium entry in human neutrophils by activating calcium independent phospholipase A2 (En révision).
5. Cerra M.C., Gallo M.P., Angelone T., Quintieri A.M., Pulerà E., Filice E., Guérold B., **Shooshtarizadeh P**, Levi R., Ramella R., Brero A., Boero O., Metz-Boutigue M.-H., Tota B., Alloatti G. The homologous rat chromogranin A1-64 (rCGA1-64) modulates myocardial and coronary function in rat heart to counteract adrenergic stimulation indirectly via endothelium-derived nitric oxide. *FASEB J.* 2008 Aug 12.
6. A. James Mason, Ward Moussaoui, Tamer Abdelrahman, Alyae Boukhari, Philippe Bertani, Arnaud Marquette, **Peiman Shooshtarizadeh**, Gilles Moulay, Nelly Boehm, Bernard Guerold, Antoine Kichler, Marie-Hélène Metz-Boutigue, Ermanno Candolfi, Gilles Prévost, Burkhard Bechinger. Structural determinants of antimicrobial and antiplasmodial activity and selectivity in histidine rich amphipathic cationic peptides. *J. Biol. Chem.* 2008 Nov 4.

Liste des communications

9 Liste des communications

1. 14th symposium Chromaffin Cell Biology, Sestri Levante, Italy, October 11—15, 2007 : Implication of Vasostatin(s) in innate immunity and in the cross talk microorganism–host. Metz–Boutigue M.–H., Zhang D., **Shooshtarizadeh P.**, Colin D., Prevost G., Delalande F., Aunis D., Schneider F.
2. 5th Forum of European Neuroscience, Vienna, Austria, July 8—12, 2006 poster : New Structural and functional aspects of chromogranins, **Shooshtarizadeh P.**, Gasnier C., Delalande F., Aunis D., Metz–Boutigue M.–H.
3. Neurex annual meeting, Basal, Switzerland, March 29, 2006 poster : Subcellular localization of Ubiquitin–activating E1 in bovine chromaffin cells, **Shooshtarizadeh P.**, Gaub P., Gasnier C., Ciesielski–Treska J., Delalande F., Aunis D., Metz–Boutigue M.–H.
4. 34^{ème} colloque de la Société de Neuroendocrinologie, Tours, France, September 25—27, 2007 poster : Identification of new chromogranins(a/b) derived antimicrobial peptides upon incubation with *Staphylococcus aureus* v8 protease : a matter of host–pathogen cross talk, **Shooshtarizadeh P.**, Gasnier C., Delalande F., Aunis D., Metz–Boutigue M.–H.

Bibliographie

Bibliographie

- Aardal, S., Helle, K. B., Elsayed, S., Reed, R. K., 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) :405–12.
- Abbas, A. K. et Lichtman, A. H. (2005). *Cellular and Molecular Immunology*, chapter General Properties of Immune Response, pages 3–15. Saunders, Elsevier.
- Abrami, L., Leppla, S. H., et van der Goot, F. G. (2006). Receptor palmitoylation and ubiquitination regulate anthrax toxin endocytosis. *J Cell Biol*, 172(2) :309–20.
- Abreu, M. T., Vora, P., Faure, E., Thomas, L. S., Arnold, E. T., et Arditi, M. (2001). Decreased expression of toll-like receptor-4 and md-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*, 167(3) :1609–1616.
- Agerberth, B., Charo, J., Werr, J., Olsson, B., Idali, F., Lindbom, L., Kiessling, R., Jörnvall, H., Wigzell, H., et Gudmundsson, G. H. (2000). The human antimicrobial and chemotactic peptides ll-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood*, 96(9) :3086–93.
- Aguliar, R. C. et Wendland, B. (2003). Ubiquitin : not just for proteasomes anymore. *Curr Opin Cell Biol*, 15(2) :184–90.
- Al-Hakim, A. K., Zagorska, A., Chapman, L., Deak, M., Peggie, M., et Alessi, D. R. (2008). Control of ampk-related kinases by usp9x and atypical lys(29)/lys(33)-linked polyubiquitin chains. *Biochem J*, 411(2) :249–60.
- Albiol-Matancic, V. C. et Castilla, V. (2004). Antiviral activity of antimicrobial cationic peptides against junin virus and herpes simplex virus. *Int J Antimicrob Agents*, 23(4) :382–9.
- Almeida, R. P., Vanet, A., Witko-Sarsat, V., Melchior, M., McCabe, D., et Gabay, J. E. (1996). Azurocidin, a natural antibiotic from human neutrophils : expression, antimicrobial activity, and secretion. *Protein Expr Purif*, 7(4) :355–66.
- Alonso, S., Pethe, K., Russell, D. G., et Purdy, G. E. (2007). Lysosomal killing of mycobacterium mediated by ubiquitin-derived peptides is enhanced by autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(14) :6031–6036.
- Amerik, A. Y. et Hochstrasser, M. (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta*, 1695(1-3) :189–207.

- Andreu, D., Ubach, J., Boman, A., Wahlin, B., Wade, D., Merrifield, R. B., et Boman, H. G. (1992). Shortened cecropin a-melittin hybrids. significant size reduction retains potent antibiotic activity. *FEBS Lett*, 296(2) :190–194.
- Angelone, T., Quintieri, A. M., Brar, B. K., Limchaiyawat, P. T., Tota, B., Mahata, S. K., et Cerra, M. C. (2008). The antihypertensive chromogranin a-derived peptide catestatin as a novel endocrine/paracrine modulator of cardiac function : Inotropic and lusitropic actions on the rat heart. *Endocrinology*.
- Ardley, H. C. et Robinson, P. A. (2005). E3 ubiquitin ligases. *Essays Biochem*, 41 :15–30.
- Atsuta, J., Plitt, J., Bochner, B. S., et Schleimer, R. P. (1999). Inhibition of vcam-1 expression in human bronchial epithelial cells by glucocorticoids. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 20(4) :643–650.
- 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.
- Bader, M. W., Sanowar, S., Daley, M. E., Schneider, A. R., Cho, U., Xu, W., Klevit, R. E., Le Moual, H., et Miller, S. I. (2005). Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell*, 122(3) :461–472.
- Baev, D., Rivetta, A., Vylkova, S., Sun, J. N., Zeng, G.-F., Slayman, C. L., et Edgerton, M. (2004). The trk1 potassium transporter is the critical effector for killing of candida albicans by the cationic protein, histatin 5. *J Biol Chem*, 279(53) :55060–55072.
- Baggiolini, M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature*, 392(6676) :565–568.
- Bakardjiev, A. I., Theriot, J. A., et Portnoy, D. A. (2006). *Listeria monocytogenes* traffics from maternal organs to the placenta and back. *PLoS Pathog*, 2(6) :e66.
- Bals, R. et Hiemstra, P. S. (2004). Innate immunity in the lung : how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J*, 23(2) :327–333.
- Bauer, S. H., Zhang, X. Y., 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.
- Benedum, U. M., Baeuerle, P. A., Konecki, D. S., Frank, R., Powell, J., Mallet, J., et Huttner, W. B. (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) :1495–502.
- Benedum, U. M., Lamouroux, A., Konecki, D. S., Rosa, P., Hille, A., Baeuerle, P. A., Frank, R., Lottspeich, F., Mallet, J., et Huttner, W. B. (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) :1203–11.
- Benjannet, S., Leduc, R., Lazure, C., Seidah, N. G., Marcinkiewicz, M., et Chrétien, M. (1985). Gawka, a novel human pituitary polypeptide : isolation, immunocytochemical localization and complete amino acid sequence. *Biochem Biophys Res Commun*, 126(1) :602–9.

- Benschop, R. J., Nieuwenhuis, E. E., Tromp, E. A., Godaert, G. L., Ballieux, R. E., et van Doornen, L. J. (1994). Effects of beta-adrenergic blockade on immunologic and cardiovascular changes induced by mental stress. *Circulation*, 89(2) :762–769.
- Beranova-Giorgianni, S., Zhao, Y., Desiderio, D. M., et Giorgianni, F. (2006). Phosphoproteomic analysis of the human pituitary. *Pituitary*, 9(2) :109–20.
- Beuret, N., Stettler, H., Renold, A., Rutishauser, J., et Spiess, M. (2004). Expression of regulated secretory proteins is sufficient to generate granule-like structures in constitutively secreting cells. *J Biol Chem*, 279(19) :20242–9.
- Beutler, B. (2004). Inferences, questions and possibilities in toll-like receptor signalling. *Nature*, 430(6996) :257–263.
- Biron, C. A., Nguyen, K. B., Pien, G. C., Cousens, L. P., et Salazar-Mather, T. P. (1999). Natural killer cells in antiviral defense : function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol*, 17 :189–220.
- 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.
- Blashko, H. et Welch, A. D. (1953). Localization of adrenaline in cytoplasmic particles of the bovine adrenal medulla. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol*, 219(1-2) :17–22.
- Boman, H. G., Wade, D., Boman, I. A., Wahlin, B., et Merrifield, R. B. (1989). Antibacterial and antimalarial properties of peptides that are cecropin-melittin hybrids. *FEBS Lett*, 259(1) :103–106.
- Bowdish, D. M. E., Davidson, D. J., et Hancock, R. E. W. (2005). A re-evaluation of the role of host defence peptides in mammalian immunity. *Curr Protein Pept Sci*, 6(1) :35–51.
- Bowdish, D. M. E., Davidson, D. J., Speert, D. P., et Hancock, R. E. W. (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.
- Bowdish, D. M. E. et Hancock, R. E. W. (2005). Anti-endotoxin properties of cationic host defence peptides and proteins. *J Endotoxin Res*, 11(4) :230–236.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72 :248–254.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., et Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663) :1532–1535.
- Briolat, J., Wu, S. D., Mahata, S. K., Gonthier, B., Bagnard, D., Chasserot-Golaz, S., Helle, K. B., Aunis, D., et Metz-Boutigue, M. H. (2005). New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin a. *Cell Mol Life Sci*, 62(3) :377–85.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides : pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 3(3) :238–250.

- Brogden, K. A., Guthmiller, J. M., Salzet, M., et Zasloff, M. (2005). The nervous system and innate immunity : the neuropeptide connection. *Nat Immunol*, 6(6) :558–564.
- Bulenda, D. et Gratzl, M. (1985). Matrix free ca²⁺ in isolated chromaffin vesicles. *Biochemistry*, 24(26) :7760–5.
- Bulet, P., Dimarcq, J. L., Hetru, C., Lagueux, M., Charlet, M., Hegy, G., Van Dorsselaer, A., et Hoffmann, J. A. (1993). A novel inducible antibacterial peptide of drosophila carries an o-glycosylated substitution. *J Biol Chem*, 268(20) :14893–14897.
- Bulet, P., Hetru, C., Dimarcq, J. L., et Hoffmann, D. (1999). Antimicrobial peptides in insects ; structure and function. *Dev Comp Immunol*, 23(4-5) :329–344.
- Butts, C. L. et Sternberg, E. M. (2008). Neuroendocrine factors alter host defense by modulating immune function. *Cell Immunol*.
- Buyon, J. P., Korchak, H. M., Rutherford, L. E., Ganguly, M., et Weissmann, G. (1984). Female hormones reduce neutrophil responsiveness in vitro. *Arthritis Rheum*, 27(6) :623–630.
- Cadwell, K. et Coscoy, L. (2005). Ubiquitination on nonlysine residues by a viral e3 ubiquitin ligase. *Science*, 309(5731) :127–30.
- Campos, M. A., Vargas, M. A., Regueiro, V., Llompert, C. M., Albertí, S., et Bengoechea, J. A. (2004). Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun*, 72(12) :7107–14.
- Caron, G., Duluc, D., Fremaux, I., Jeannin, P., David, C., Gascan, H., et Delneste, Y. (2005). Direct stimulation of human t cells via tlr5 and tlr7/8 : flagellin and r-848 up-regulate proliferation and ifn-gamma production by memory cd4+ t cells. *J Immunol*, 175(3) :1551–1557.
- Cerra, M. C., 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.
- Chain, B. M. (2003). Current issues in antigen presentation–focus on the dendritic cell. *Immunol Lett*, 89(2-3) :237–241.
- Chan, N. L. et Hill, C. P. (2001). Defining polyubiquitin chain topology. *Nat Struct Biol*, 8(8) :650–2.
- Chanat, E. et Huttner, W. B. (1991). Milieu-induced, selective aggregation of regulated secretory proteins in the trans-golgi network. *J Cell Biol*, 115(6) :1505–19.
- Chelmicka-Schorr, E., Checinski, M., et Arnason, B. G. (1988). Sympathectomy augments the severity of experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Ann N Y Acad Sci*, 540 :707–708.
- Chen, X., Niyonsaba, F., Ushio, H., Nagaoka, I., Ikeda, S., Okumura, K., et Ogawa, H. (2006). Human cathelicidin ll-37 increases vascular permeability in the skin via mast cell activation, and phosphorylates map kinases p38 and erk in mast cells. *J Dermatol Sci*, 43(1) :63–66.

- Chertov, O., Michiel, D. F., Xu, L., Wang, J. M., Tani, K., Murphy, W. J., Longo, D. L., Taub, D. D., et Oppenheim, J. J. (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.
- Chertov, O., Yang, D., Howard, O. M., et Oppenheim, J. J. (2000). Leukocyte granule proteins mobilize innate host defenses and adaptive immune responses. *Immunol Rev*, 177 :68–78.
- Ciechanover, A. et Ben-Saadon, R. (2004). N-terminal ubiquitination : more protein substrates join in. *Trends Cell Biol*, 14(3) :103–6.
- Ciesielski-Treska, J., Ulrich, G., Taupenot, L., Chasserot-Golaz, S., Corti, A., Aunis, D., et Bader, M. F. (1998). Chromogranin a induces a neurotoxic phenotype in brain microglial cells. *J Biol Chem*, 273(23) :14339–46.
- Clark, R. et Kupper, T. (2005). Old meets new : the interaction between innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol*, 125(4) :629–637.
- Coffelt, S. B., Waterman, R. S., Florez, L., zu Bentrup, K. H., Zvezdaryk, K. J., Tomchuck, S. L., La-Marca, H. L., Danka, E. S., Morris, C. A., et Scandurro, A. B. (2008). Ovarian cancers overexpress the antimicrobial protein hcgp-18 and its derivative ll-37 increases ovarian cancer cell proliferation and invasion. *Int J Cancer*, 122(5) :1030–9.
- Cohen, S., Bigazzi, P. E., et Yoshida, T. (1974). Commentary. similarities of t cell function in cell-mediated immunity and antibody production. *Cell Immunol*, 12(1) :150–159.
- Conlon, J. M., 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) :639–44.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., et Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, 22(11) :633–640.
- 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 cardiostatsins on the isolated working frog heart. *Gen Comp Endocrinol*, 136(2) :217–24.
- Coulombe, P., Rodier, G., Pelletier, S., Pellerin, J., et Meloche, S. (2003). Rapid turnover of extracellular signal-regulated kinase 3 by the ubiquitin-proteasome pathway defines a novel paradigm of mitogen-activated protein kinase regulation during cellular differentiation. *Mol Cell Biol*, 23(13) :4542–58.
- Coupland, R. E., Pyper, A. S., et Hopwood, D. (1964). A method for differentiating between noradrenaline- and adrenaline-storing cells in the light and electron microscope. *Nature*, 201 :1240–2.
- Courel, M., Rodemer, C., Nguyen, S. T., Pance, A., Jackson, A. P., O'connor, D. T., et Taupenot, L. (2006). Secretory granule biogenesis in sympathoadrenal cells : identification of a granulogenic determinant in the secretory prohormone chromogranin a. *J Biol Chem*, 281(49) :38038–51.
- Cronstein, B. N., Kimmel, S. C., Levin, R. I., Martiniuk, F., et Weissmann, G. (1992). A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids : the glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(21) :9991–9995.

- Cuervo, A. M. (2004). Autophagy : in sickness and in health. *Trends Cell Biol*, 14(2) :70–77.
- Danilova, N. (2006). The evolution of immune mechanisms. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 306(6) :496–520.
- Davidson, D. J., Currie, A. J., Reid, G. S. D., Bowdish, D. M. E., MacDonald, K. L., Ma, R. C., Hancock, R. E. W., et Speert, D. P. (2004). The cationic antimicrobial peptide ll-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced t cell polarization. *J Immunol*, 172(2) :1146–56.
- Delneste, Y., Beauvillain, C., et Jeannin, P. (2007). Innate immunity : structure and function of tlr. *Med Sci (Paris)*, 23(1) :67–73.
- Demartino, G. N. et Gillette, T. G. (2007). Proteasomes : machines for all reasons. *Cell*, 129(4) :659–62.
- Dennison, S. R., Howe, J., Morton, L. H. G., Brandenburg, K., Harris, F., et Phoenix, D. A. (2006). Interactions of an anionic antimicrobial peptide with staphylococcus aureus membranes. *Biochem Biophys Res Commun*, 347(4) :1006–10.
- Depreitere, J., Durinx, C., Wang, Z., Coen, E., Lambeir, A.-M., Scharpé, S., De Potter, W., et Nouwen, E. J. (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) :71–9.
- Depreitere, J., Wang, Z., Liang, F., Coen, E., et Nouwen, E. J. (2004). Presence and release of the chromogranin b-derived secretolytin-like peptide kr-11 from the porcine spleen. *Regul Pept*, 122(2) :99–107.
- Deretic, V. (2006). Autophagy as an immune defense mechanism. *Curr Opin Immunol*, 18(4) :375–382.
- Derossi, D., Joliot, A. H., Chassaing, G., et Prochiantz, A. (1994). The third helix of the antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*, 269(14) :10444–50.
- Dopazo, A., Lovenberg, T. W., Danielson, P. E., Ottiger, H. P., et Sutcliffe, J. G. (1993). Primary structure of mouse secretogranin iii and its absence from deficient mice. *J Mol Neurosci*, 4(4) :225–33.
- Døskeland, A. P. et Flatmark, T. (2002). Ubiquitination of soluble and membrane-bound tyrosine hydroxylase and degradation of the soluble form. *Eur J Biochem*, 269(5) :1561–1569.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., et Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting : from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*, 3(11) :991–8.
- Dürr, U. H. N., Sudheendra, U. S., et Ramamoorthy, A. (2006). Ll-37, the only human member of the cathelicidin family of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*, 1758(9) :1408–1425.
- Dutton, R. W. (1967). In vitro studies of immunological responses of lymphoid cells. *Adv Immunol*, 6 :253–336.
- Eiden, L. E. (1987). Is chromogranin a prohormone? *Nature*, 325(6102) :301.
- El Amri, C. et Nicolas, P. (2008). Plasticins : membrane-damaging peptides with 'chameleon-like' properties. *Cell Mol Life Sci*, 65(6) :895–909.

- Elsasser, S., Gali, R. R., Schwickart, M., Larsen, C. N., Leggett, D. S., Müller, B., Feng, M. T., Tübing, F., Dittmar, G. A. G., et Finley, D. (2002). Proteasome subunit rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol*, 4(9) :725–30.
- Erlebacher, A., Zhang, D., Parlow, A. F., et Glimcher, L. H. (2004). Ovarian insufficiency and early pregnancy loss induced by activation of the innate immune system. *J Clin Invest*, 114(1) :39–48.
- Erspamer, V. (1971). Biogenic amines and active polypeptides of the amphibian skin. *Annu Rev Pharmacol*, 11 :327–350.
- Esche, C., Stellato, C., et Beck, L. A. (2005). Chemokines : key players in innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol*, 125(4) :615–628.
- Faber, C., Stallmann, H. P., Lyaruu, D. M., Joosten, U., von Eiff, C., van Nieuw Amerongen, A., et Wuisman, P. I. J. M. (2005). Comparable efficacies of the antimicrobial peptide human lactoferrin 1-11 and gentamicin in a chronic methicillin-resistant staphylococcus aureus osteomyelitis model. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(6) :2438–44.
- Fales-Williams, A. J., Brogden, K. A., Huffman, E., Gallup, J. M., et Ackermann, M. R. (2002). Cellular distribution of anionic antimicrobial peptide in normal lung and during acute pulmonary inflammation. *Vet Pathol*, 39(6) :706–11.
- Fallon, L., Bélanger, C. M. L., Corera, A. T., Kontogianna, M., Regan-Klapisz, E., Moreau, F., Voortman, J., Haber, M., Rouleau, G., Thorarinsdottir, T., Brice, A., van Bergen En Henegouwen, P. M. P., et Fon, E. A. (2006). A regulated interaction with the uim protein eps15 implicates parkin in egf receptor trafficking and pi(3)k-akt signalling. *Nat Cell Biol*, 8(8) :834–42.
- Farràs, R., Bossis, G., Andermarcher, E., Jariel-Encontre, I., et Piechaczyk, M. (2005). Mechanisms of delivery of ubiquitylated proteins to the proteasome : new target for anti-cancer therapy ? *Crit Rev Oncol Hematol*, 54(1) :31–51.
- Fasciotto, B. H., Gorr, S. U., DeFranco, D. J., Levine, M. A., et Cohn, D. V. (1989). Pancreastatin, a presumed product of chromogranin-a (secretory protein-i) processing, inhibits secretion from porcine parathyroid cells in culture. *Endocrinology*, 125(3) :1617–22.
- Fischer-Colbrie, R., Gutierrez, J., Hsu, C. M., Iacangelo, A., et Eiden, L. E. (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) :9208–13.
- 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 :120–34.
- Fischer-Colbrie, R., Laslop, A., et Kirchmair, R. (1995). Secretogranin ii : molecular properties, regulation of biosynthesis and processing to the neuropeptide secretoneurin. *Prog Neurobiol*, 46(1) :49–70.
- Flanagan, T., Taylor, L., Poulter, L., Viveros, O. H., et Diliberto, E. J. J. (1990). A novel 1745-dalton pyroglutamyl peptide derived from chromogranin b is in the bovine adrenomedullary chromaffin vesicle. *Cell Mol Neurobiol*, 10(4) :507–23.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of b. influenzae. *Br J Exp Pathol*, X :3–13.

- Forss-Petter, S., Danielson, P., Battenberg, E., Bloom, F., et Sutcliffe, J. G. (1989). Nucleotide sequence and cellular distribution of rat chromogranin b (secretogranin i) mrna in the neuroendocrine system. *J Mol Neurosci*, 1(2) :63–75.
- Fritsche, T. R., Rhomberg, P. R., Sader, H. S., et Jones, R. N. (2008). Antimicrobial activity of omiganan pentahydrochloride against contemporary fungal pathogens responsible for catheter-associated infections. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(3) :1187–9.
- Fukumoto, K., Nagaoka, I., Yamataka, A., Kobayashi, H., Yanai, T., Kato, Y., et Miyano, T. (2005). Effect of antibacterial cathelicidin peptide cap18/11-37 on sepsis in neonatal rats. *Pediatr Surg Int*, 21(1) :20–4.
- Gabay, J. E. et Almeida, R. P. (1993). Antibiotic peptides and serine protease homologs in human polymorphonuclear leukocytes : defensins and azurocidin. *Curr Opin Immunol*, 5(1) :97–102.
- Gadroy, P., Stridsberg, M., Capon, C., Michalski, J. C., Strub, J. M., Van Dorsselaer, A., Aunis, D., et Metz-Boutigue, M. H. (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.
- Galan, J. M. et Haguenauer-Tsapis, R. (1997). Ubiquitin lys63 is involved in ubiquitination of a yeast plasma membrane protein. *EMBO J*, 16(19) :5847–54.
- Galindo, E., Rill, A., Bader, M. F., et Aunis, D. (1991). Chromostatin, a 20-amino acid peptide derived from chromogranin a, inhibits chromaffin cell secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(4) :1426–30.
- Gallo, M. P., Levi, R., Ramella, R., Brero, A., Boero, O., Tota, B., et Alloatti, G. (2007). Endothelium-derived nitric oxide mediates the antiadrenergic effect of human vasostatin-1 in rat ventricular myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292(6) :H2906–12.
- Gambichler, T., Skrygan, M., Tomi, N. S., Altmeyer, P., et Kreuter, A. (2006). Changes of antimicrobial peptide mrna expression in atopic eczema following phototherapy. *Br J Dermatol*, 155(6) :1275–8.
- Gasnier, C., Lugardon, K., Ruh, O., Strub, J.-M., Aunis, D., et Metz-Boutigue, M.-H. (2004). Characterization and location of post-translational modifications on chromogranin b from bovine adrenal medullary chromaffin granules. *Proteomics*, 4(6) :1789–1801.
- Geetha, T., Jiang, J., et Wooten, M. W. (2005). Lysine 63 polyubiquitination of the nerve growth factor receptor trka directs internalization and signaling. *Mol Cell*, 20(2) :301–12.
- Geraldes, P., Gagnon, S., Hadjadj, S., Merhi, Y., Sirois, M. G., Cloutier, I., et Tanguay, J.-F. (2006). Estradiol blocks the induction of cd40 and cd40l expression on endothelial cells and prevents neutrophil adhesion : an eralpha-mediated pathway. *Cardiovasc Res*, 71(3) :566–573.
- Gerdes, H. H., Rosa, P., Phillips, E., Baeuerle, P. A., Frank, R., Argos, P., et Huttner, W. B. (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) :12009–15.
- Ghia, J.-E., Crenner, F., Metz-Boutigue, M.-H., Aunis, D., et Angel, F. (2004a). 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) :1787–99.

- Ghia, J.-E., Crenner, F., Metz-Boutigue, M.-H., Aunis, D., et Angel, F. (2004b). 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.
- Ghia, J.-E., Crenner, F., Rohr, S., Meyer, C., Metz-Boutigue, M.-H., Aunis, D., et Angel, F. (2004c). A role for chromogranin a (4-16), a vasostatin-derived peptide, on human colonic motility. an in vitro study. *Regul Pept*, 121(1-3) :31–9.
- Ghia, J.-E., Pradaud, I., Crenner, F., Metz-Boutigue, M.-H., Aunis, D., et Angel, F. (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.
- Giannakopoulos, N. V., Luo, J.-K., Papov, V., Zou, W., Lenschow, D. J., Jacobs, B. S., Borden, E. C., Li, J., Virgin, H. W., et Zhang, D.-E. (2005). Proteomic identification of proteins conjugated to isg15 in mouse and human cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 336(2) :496–506.
- Giorgianni, F., Beranova-Giorgianni, S., et Desiderio, D. M. (2004). Identification and characterization of phosphorylated proteins in the human pituitary. *Proteomics*, 4(3) :587–98.
- Glattard, E., Angelone, T., Strub, J.-M., Corti, A., Aunis, D., Tota, B., Metz-Boutigue, M.-H., et Goumon, Y. (2006). Characterization of natural vasostatin-containing peptides in rat heart. *FEBS J*, 273(14) :3311–21.
- Glombik, M. M., Krömer, A., Salm, T., Huttner, W. B., et Gerdes, H. H. (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) :1059–70.
- Goehring, A. S., Rivers, D. M., et Sprague, G. F. J. (2003). Attachment of the ubiquitin-related protein urm1p to the antioxidant protein ahp1p. *Eukaryot Cell*, 2(5) :930–6.
- Goldstein, A. L., Slater, F. D., et White, A. (1966). Preparation, assay, and partial purification of a thymic lymphocytopoietic factor (thymosin). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 56(3) :1010–7.
- Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D. H., Niall, H. D., et Boyse, E. A. (1975). Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(1) :11–5.
- Goumon, Y., Lugardon, K., Kieffer, B., Lefèvre, J. F., Van Dorsselaer, A., Aunis, D., et 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(45) :29847–29856.
- Goumon, Y., Strub, J. M., Moniatte, M., Nullans, G., Poteur, L., Hubert, P., Van Dorsselaer, A., Aunis, D., et 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(3) :516–525.
- Greenberg, S. et Grinstein, S. (2002). Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol*, 14(1) :136–145.

- Guermontprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., et Amigorena, S. (2003). Er-phagosome fusion defines an mhc class i cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*, 425(6956) :397–402.
- Haas, A. L. et Bright, P. M. (1985). The immunochemical detection and quantitation of intracellular ubiquitin-protein conjugates. *J Biol Chem*, 260(23) :12464–73.
- Haglund, K., Di Fiore, P. P., et Dikic, I. (2003). Distinct monoubiquitin signals in receptor endocytosis. *Trends Biochem Sci*, 28(11) :598–603.
- Haglund, K. et Dikic, I. (2005). Ubiquitylation and cell signaling. *EMBO J*, 24(19) :3353–9.
- Haigh, J. R., Parris, R., et Phillips, J. H. (1989). Free concentrations of sodium, potassium and calcium in chromaffin granules. *Biochem J*, 259(2) :485–91.
- Hancock, R. E. (2001). Cationic peptides : effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *Lancet Infect Dis*, 1(3) :156–64.
- Hancock, R. E. W. et Sahl, H.-G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*, 24(12) :1551–7.
- Hayden, M. S. et Ghosh, S. (2008). Shared principles in nf-kappab signaling. *Cell*, 132(3) :344–62.
- Hayward, B. E., Moran, V., Strain, L., et Bonthron, D. T. (1998). Bidirectional imprinting of a single gene : Gnas1 encodes maternally, paternally, and biallelically derived proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(26) :15475–80.
- Heilborn, J. D., Nilsson, M. F., Kratz, G., Weber, G., Sørensen, O., Borregaard, N., et Ståhle-Bäckdahl, M. (2003). The cathelicidin anti-microbial peptide ll-37 is involved in re-epithelialization of human skin wounds and is lacking in chronic ulcer epithelium. *J Invest Dermatol*, 120(3) :379–89.
- Helle, K. B. (2004). The granin family of uniquely acidic proteins of the diffuse neuroendocrine system : comparative and functional aspects. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 79(4) :769–94.
- Henkel, A. W., Horstmann, H., et Henkel, M. K. (2001). Direct observation of membrane retrieval in chromaffin cells by capacitance measurements. *FEBS Lett*, 505(3) :414–8.
- Henriques, S. T., Melo, M. N., et Castanho, M. A. R. B. (2006). Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides : how different are they ? *Biochem J*, 399(1) :1–7.
- Hershko, A., Ciechanover, A., et Varshavsky, A. (2000). Basic medical research award. the ubiquitin system. *Nat Med*, 6(10) :1073–1081.
- Hertz, C. J., Wu, Q., Porter, E. M., Zhang, Y. J., Weismüller, K.-H., Godowski, P. J., Ganz, T., Randell, S. H., et Modlin, R. L. (2003). Activation of toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. *J Immunol*, 171(12) :6820–6.
- Hicke, L. et Dunn, R. (2003). Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 19 :141–72.
- Hicke, L. et Riezman, H. (1996). Ubiquitination of a yeast plasma membrane receptor signals its ligand-stimulated endocytosis. *Cell*, 84(2) :277–87.

- Hiemstra, P. S. (2001). Epithelial antimicrobial peptides and proteins : their role in host defence and inflammation. *Paediatr Respir Rev*, 2(4) :306–10.
- Hieshima, K., Ohtani, H., Shibano, M., Izawa, D., Nakayama, T., Kawasaki, Y., Shiba, F., Shiota, M., Katou, F., Saito, T., et Yoshie, O. (2003). Ccl28 has dual roles in mucosal immunity as a chemokine with broad-spectrum antimicrobial activity. *J Immunol*, 170(3) :1452–1461.
- Hillarp, N. A. (1958). Isolation and some biochemical properties of the catechol amine granules in the cow adrenal medulla. *Acta Physiol Scand*, 43(1) :82–96.
- Hillarp, N. A., Lagerstedt, S., et Nilson, B. (1953). The isolation of a granular fraction from the suprarenal medulla, containing the sympathomimetic catechol amines. *Acta Physiol Scand*, 29(2-3) :251–63.
- Hipp, M. S., Kalveram, B., Raasi, S., Groettrup, M., et Schmidtke, G. (2005). Fat10, a ubiquitin-independent signal for proteasomal degradation. *Mol Cell Biol*, 25(9) :3483–91.
- Hironaka, M., Ansai, T., Soh, I., Ishisaka, A., Awano, S., Yoshida, A., Hamasaki, T., Sonoki, K., Takata, Y., et Takehara, T. (2008). Association between salivary levels of chromogranin a and periodontitis in older japanese. *Biomed Res*, 29(3) :125–30.
- Hoeller, D., Hecker, C.-M., Wagner, S., Rogov, V., Dötsch, V., et Dikic, I. (2007). E3-independent monoubiquitination of ubiquitin-binding proteins. *Mol Cell*, 26(6) :891–8.
- Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A., et Ezekowitz, R. A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 284(5418) :1313–1318.
- Hoskin, D. W. et Ramamoorthy, A. (2008). Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. *Biochim Biophys Acta*, 1778(2) :357–75.
- Hsu, J. C. Y. et Yip, C. M. (2007). Molecular dynamics simulations of indolicidin association with model lipid bilayers. *Biophys J*, 92(12) :L100–2.
- Huang, F., Kirkpatrick, D., Jiang, X., Gygi, S., et Sorkin, A. (2006). Differential regulation of egf receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol Cell*, 21(6) :737–48.
- Huang, H. J., Ross, C. R., et Blecha, F. (1997). Chemoattractant properties of pr-39, a neutrophil antibacterial peptide. *J Leukoc Biol*, 61(5) :624–9.
- Huh, Y. H., Bahk, S. J., Ghee, J. Y., et Yoo, S. H. (2005). Subcellular distribution of chromogranins a and b in bovine adrenal chromaffin cells. *FEBS Lett*, 579(23) :5145–51.
- Huh, Y. H., Jeon, S. H., et Yoo, S. H. (2003). Chromogranin b-induced secretory granule biogenesis : comparison with the similar role of chromogranin a. *J Biol Chem*, 278(42) :40581–9.
- Hurley, J. H., Lee, S., et Prag, G. (2006). Ubiquitin-binding domains. *Biochem J*, 399(3) :361–72.
- Huttner, W. B., Gerdes, H. H., et Rosa, P. (1991). The granin (chromogranin/secretogranin) family. *Trends Biochem Sci*, 16(1) :27–30.
- Hutton, J. C., 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) :336–40.

- Ikeda, F. et Dikic, I. (2008). Atypical ubiquitin chains : new molecular signals. 'protein modifications : Beyond the usual suspects' review series. *EMBO Rep*, 9(6) :536–42.
- Ikeda, Y., Young, L. H., Scalia, R., Ross, C. R., et Lefer, A. M. (2001). Pr-39, a proline/arginine-rich antimicrobial peptide, exerts cardioprotective effects in myocardial ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res*, 49(1) :69–77.
- Imbrogno, S., Angelone, T., Corti, A., Adamo, C., Helle, K. B., 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) :20–8.
- 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) :11657–62.
- Jacobsen, F., Mittler, D., Hirsch, T., Gerhards, A., Lehnhardt, M., Voss, B., Steinau, H. U., et Steinstraesser, L. (2005). Transient cutaneous adenoviral gene therapy with human host defense peptide hcap-18/ll-37 is effective for the treatment of burn wound infections. *Gene Ther*, 12(20) :1494–502.
- Janeway, C. A. J. et Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20 :197–216.
- Jenssen, H., Andersen, J. H., Uhlin-Hansen, L., Gutteberg, T. J., et Rekdal, Ø. (2004). Anti-hsv activity of lactoferricin analogues is only partly related to their affinity for heparan sulfate. *Antiviral Res*, 61(2) :101–9.
- Jenssen, H., Gutteberg, T. J., et Lejon, T. (2005). Modelling the anti-herpes simplex virus activity of small cationic peptides using amino acid descriptors. *J Pept Res*, 66 Suppl 1 :48–56.
- Jenssen, H., Hamill, P., et Hancock, R. E. W. (2006). Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev*, 19(3) :491–511.
- Jetschmann, J. U., Benschop, R. J., Jacobs, R., Kemper, A., Oberbeck, R., Schmidt, R. E., 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.
- Jin, Y., Hammer, J., Pate, M., Zhang, Y., Zhu, F., Zmuda, E., et Blazyk, J. (2005). Antimicrobial activities and structures of two linear cationic peptide families with various amphipathic beta-sheet and alpha-helical potentials. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(12) :4957–64.
- Johnson, E. S. (2004). Protein modification by sumo. *Annu Rev Biochem*, 73 :355–82.
- Johnson, J. D., Campisi, J., Sharkey, C. M., Kennedy, S. L., Nickerson, M., et Fleshner, M. (2005). Adrenergic receptors mediate stress-induced elevations in extracellular hsp72. *J Appl Physiol*, 99(5) :1789–1795.
- Kabelitz, D. et Medzhitov, R. (2007). Innate immunity–cross-talk with adaptive immunity through pattern recognition receptors and cytokines. *Curr Opin Immunol*, 19(1) :1–3.
- Kanayama, A., Seth, R. B., Sun, L., Ea, C.-K., Hong, M., Shaito, A., Chiu, Y.-H., Deng, L., et Chen, Z. J. (2004). Tab2 and tab3 activate the nf-kappab pathway through binding to polyubiquitin chains. *Mol Cell*, 15(4) :535–48.

- Kang, Y. K. et Yoo, S. H. (1997). Identification of the secretory vesicle membrane binding region of chromogranin a. *FEBS Lett*, 404(1) :87–90.
- Kato, A., Favoreto, S. J., Avila, P. C., et Schleimer, R. P. (2007). Tlr3- and th2 cytokine-dependent production of thymic stromal lymphopoietin in human airway epithelial cells. *J Immunol*, 179(2) :1080–1087.
- Kavanagh, K. et Dowd, S. (2004). Histatins : antimicrobial peptides with therapeutic potential. *J Pharm Pharmacol*, 56(3) :285–289.
- Kawaguchi, M., Minami, K., Nagashima, K., et Seino, S. (2006). Essential role of ubiquitin-proteasome system in normal regulation of insulin secretion. *J Biol Chem*, 281(19) :13015–20.
- Kawai, T. et Akira, S. (2007). Tlr signaling. *Semin Immunol*, 19(1) :24–32.
- 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 :2063–2085.
- Kennedy, B. P., Mahata, S. K., O’Connor, D. T., et Ziegler, M. G. (1998). Mechanism of cardiovascular actions of the chromogranin a fragment catestatin in vivo. *Peptides*, 19(7) :1241–8.
- Kerscher, O., Felberbaum, R., et Hochstrasser, M. (2006). Modification of proteins by ubiquitin and ubiquitin-like proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22 :159–80.
- Khandelia, H. et Kaznessis, Y. N. (2007). Cation- π interactions stabilize the structure of the antimicrobial peptide indolicidin near membranes : molecular dynamics simulations. *J Phys Chem B*, 111(1) :242–50.
- Kieffer, A.-E., Goumon, Y., Ruh, O., Chasserot-Golaz, S., Nullans, G., Gasnier, C., Aunis, D., et Metz-Boutigue, M.-H. (2003). The n- and c-terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities. *FASEB J*, 17(6) :776–778.
- Kiessling, R., Klein, E., et Wigzell, H. (1975). "natural" killer cells in the mouse. i. cytotoxic cells with specificity for mouse moloney leukemia cells. specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*, 5(2) :112–117.
- Kim, H. T., Kim, K. P., Lledias, F., Kisselev, A. F., Scaglione, K. M., Skowyra, D., Gygi, S. P., et Goldberg, A. L. (2007). Certain pairs of ubiquitin-conjugating enzymes (e2s) and ubiquitin-protein ligases (e3s) synthesize nondegradable forked ubiquitin chains containing all possible isopeptide linkages. *J Biol Chem*, 282(24) :17375–86.
- Kim, T. et Loh, Y. P. (2006). Protease nexin-1 promotes secretory granule biogenesis by preventing granule protein degradation. *Mol Biol Cell*, 17(2) :789–98.
- Kim, T., Tao-Cheng, J. H., Eiden, L. E., et Loh, Y. P. (2001). Chromogranin a, an "on/off" switch controlling dense-core secretory granule biogenesis. *Cell*, 106(4) :499–509.
- Klotman, M. E. et Chang, T. L. (2006). Defensins in innate antiviral immunity. *Nat Rev Immunol*, 6(6) :447–56.

- Koczulla, R., von Degenfeld, G., Kupatt, C., Krötz, F., Zahler, S., Gloe, T., Issbrücker, K., Unterberger, P., Zaiou, M., Lebherz, C., Karl, A., Raake, P., Pfosser, A., Boekstegers, P., Welsch, U., Hiemstra, P. S., Vogelmeier, C., Gallo, R. L., Clauss, M., et Bals, R. (2003). An angiogenic role for the human peptide antibiotic Il-37/hcap-18. *J Clin Invest*, 111(11):1665–1672.
- Kölling, R. et Hollenberg, C. P. (1994). The abc-transporter ste6 accumulates in the plasma membrane in a ubiquitinated form in endocytosis mutants. *EMBO J*, 13(14):3261–71.
- Komada, M. et Kitamura, N. (2005). The hrs/stam complex in the downregulation of receptor tyrosine kinases. *J Biochem*, 137(1):1–8.
- Komatsu, M., Chiba, T., Tatsumi, K., Iemura, S.-i., Tanida, I., Okazaki, N., Ueno, T., Kominami, E., Natsume, T., et Tanaka, K. (2004). A novel protein-conjugating system for ufm1, a ubiquitin-fold modifier. *EMBO J*, 23(9):1977–86.
- Konecki, D. S., Benedum, U. M., Gerdes, H. H., et Huttner, W. B. (1987). The primary structure of human chromogranin a and pancreastatin. *J Biol Chem*, 262(35):17026–30.
- 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):100–8.
- Kristian, S. A., Dürr, M., Van Strijp, J. A. G., Neumeister, B., et Peschel, A. (2003). Mprf-mediated lysinylation of phospholipids in staphylococcus aureus leads to protection against oxygen-independent neutrophil killing. *Infect Immun*, 71(1):546–9.
- Krüger, P.-G., Mahata, S. K., et Helle, K. B. (2003). Catestatin (cga344-364) stimulates rat mast cell release of histamine in a manner comparable to mastoparan and other cationic charged neuropeptides. *Regul Pept*, 114(1):29–35.
- Kusmann, M., Lassing, U., Sturmer, C. A., 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.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–685.
- Lai, Y., Villaruz, A. E., Li, M., Cha, D. J., Sturdevant, D. E., et Otto, M. (2007). The human anionic antimicrobial peptide dermcidin induces proteolytic defence mechanisms in staphylococci. *Mol Microbiol*, 63(2):497–506.
- Lang, K., Drell, T. L., Niggemann, B., Zänker, K. S., et Entschladen, F. (2003). Neurotransmitters regulate the migration and cytotoxicity in natural killer cells. *Immunol Lett*, 90(2-3):165–172.
- Larsson, M., Fonteneau, J. F., et Bhardwaj, N. (2001). Dendritic cells resurrect antigens from dead cells. *Trends Immunol*, 22(3):141–148.
- Laslop, A., Weiss, C., Savaria, D., Eiter, C., Tooze, S. A., Seidah, N. G., et Winkler, H. (1998). Proteolytic processing of chromogranin b and secretogranin ii by prohormone convertases. *J Neurochem*, 70(1):374–83.

- Laube, D. M., Yim, S., Ryan, L. K., Kisich, K. O., et Diamond, G. (2006). Antimicrobial peptides in the airway. *Curr Top Microbiol Immunol*, 306 :153–82.
- Le Douarin, N. (1980). Migration and differentiation of neural crest cells. *Curr Top Dev Biol*, 16 :31–85.
- Lee, D. G., Hahm, K.-S., et Shin, S. Y. (2004). Structure and fungicidal activity of a synthetic antimicrobial peptide, p18, and its truncated peptides. *Biotechnol Lett*, 26(4) :337–41.
- Lee, J. C., Taylor, C. V., Gaucher, S. P., Toneff, T., Taupenot, L., Yasothornsrikul, S., Mahata, S. K., Sei, C., Parmer, R. J., Neveu, J. M., Lane, W. S., Gibson, B. W., O'Connor, D. T., et Hook, V. Y. H. (2003). Primary sequence characterization of catestatin intermediates and peptides defines proteolytic cleavage sites utilized for converting chromogranin a into active catestatin secreted from neuroendocrine chromaffin cells. *Biochemistry*, 42(23) :6938–46.
- Lee, P. H. A., Ohtake, T., Zaiou, M., Murakami, M., Rudisill, J. A., Lin, K. H., et Gallo, R. L. (2005). Expression of an additional cathelicidin antimicrobial peptide protects against bacterial skin infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(10) :3750–5.
- Lehrer, R. I. (2004). Primate defensins. *Nat Rev Microbiol*, 2(9) :727–738.
- Lehrer, R. I., Selsted, M. E., 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.
- Lever, J. D. (1955). Electron microscopic observations on the normal and denervated adrenal medulla of the rat. *Endocrinology*, 57(5) :621–35.
- Li, W., Tu, D., Brunger, A. T., et Ye, Y. (2007). A ubiquitin ligase transfers preformed polyubiquitin chains from a conjugating enzyme to a substrate. *Nature*, 446(7133) :333–7.
- Lillard, J. W. J., Boyaka, P. N., Chertov, O., Oppenheim, J. J., et McGhee, J. R. (1999). Mechanisms for induction of acquired host immunity by neutrophil peptide defensins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(2) :651–6.
- Lim, K. L., Chew, K. C. M., Tan, J. M. M., Wang, C., Chung, K. K. K., Zhang, Y., Tanaka, Y., Smith, W., Engelender, S., Ross, C. A., Dawson, V. L., et Dawson, T. M. (2005). Parkin mediates nonclassical, proteasomal-independent ubiquitination of synphilin-1 : implications for lewy body formation. *J Neurosci*, 25(8) :2002–9.
- Linard, C. G., Mbikay, M., Seidah, N. G., et Chretien, M. (1990). Primary structure of mouse chromogranin b deduced from cDNA sequence. *Nucleic Acids Res*, 18(5) :1298.
- Lins, L. et Brasseur, R. (2008). Tilted peptides : a structural motif involved in protein membrane insertion? *J Pept Sci*, 14(4) :416–22.
- Liu, L., Roberts, A. A., et Ganz, T. (2003). By il-1 signaling, monocyte-derived cells dramatically enhance the epidermal antimicrobial response to lipopolysaccharide. *J Immunol*, 170(1) :575–80.
- Liu, Y.-C. (2004). Ubiquitin ligases and the immune response. *Annu Rev Immunol*, 22 :81–127.
- Liu, Y.-C., Penninger, J., et Karin, M. (2005). Immunity by ubiquitylation : a reversible process of modification. *Nat Rev Immunol*, 5(12) :941–52.

- Lorin, C., Saidi, H., Belaid, A., Zairi, A., Baleux, F., Hocini, H., Bélec, L., Hani, K., et Tangy, F. (2005). The antimicrobial peptide dermaseptin s4 inhibits hiv-1 infectivity in vitro. *Virology*, 334(2) :264–75.
- Lugardon, K., Chasserot-Golaz, S., Kieffer, A. E., Maget-Dana, R., Nullans, G., Kieffer, B., Aunis, D., et Metz-Boutigue, M. H. (2001). Structural and biological characterization of chromofungin, the anti-fungal chromogranin a-(47-66)-derived peptide. *J Biol Chem*, 276(38) :35875–35882.
- Lugardon, K., Raffner, R., Goumon, Y., Corti, A., Delmas, A., Bulet, P., Aunis, D., et Metz-Boutigue, M. H. (2000). Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the n-terminal fragment of chromogranin a. *J Biol Chem*, 275(15) :10745–10753.
- Luque-Ortega, J. R., van't Hof, W., Veerman, E. C. I., Saugar, J. M., et Rivas, L. (2008). Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial atp synthesis in leishmania. *FASEB J*, 22(6) :1817–28.
- Madden, K. S., Felten, S. Y., Felten, D. L., Sundaesan, P. R., 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.
- Madden, K. S., Sanders, V. M., et Felten, D. L. (1995). Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 35 :417–448.
- Maestroni, G. J. M. 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.
- Magzoub, M. et Gräslund, A. (2004). Cell-penetrating peptides : from inception to application. *Q Rev Biophys*, 37(2) :147–95.
- Mahapatra, N. R. (2008). Catestatin is a novel endogenous peptide that regulates cardiac function and blood pressure. *Cardiovasc Res*.
- Mahata, M., Mahata, S. K., Fischer-Colbrie, R., et Winkler, H. (1993). Ontogenic development and distribution of mrnas of chromogranin a and b, secretogranin ii, p65 and synaptin/synaptophysin in rat brain. *Brain Res Dev Brain Res*, 76(1) :43–58.
- Mahata, S. K., Mahata, M., Marksteiner, J., Sperk, G., Fischer-Colbrie, R., et Winkler, H. (1991). Distribution of mrnas for chromogranins a and b and secretogranin ii in rat brain. *Eur J Neurosci*, 3(9) :895–904.
- Mahata, S. K., Mahata, M., Wen, G., Wong, W. B., Mahapatra, N. R., Hamilton, B. A., et O'Connor, D. T. (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) :1180–91.
- Malina, A. et Shai, Y. (2005). Conjugation of fatty acids with different lengths modulates the antibacterial and antifungal activity of a cationic biologically inactive peptide. *Biochem J*, 390(Pt 3) :695–702.
- Marksteiner, J., Bauer, R., Kaufmann, W. A., Weiss, E., Barnas, U., et Maier, H. (1999). Pe-11, a peptide derived from chromogranin b, in the human brain. *Neuroscience*, 91(3) :1155–70.
- Maródi, L. et Notarangelo, L. D. (2007). Immunological and genetic bases of new primary immunodeficiencies. *Nat Rev Immunol*, 7(11) :851–861.

- Maury, G., Pilette, C., et Sibille, Y. (2003). Secretory immunity of the airways. *Rev Mal Respir*, 20(6 Pt 1) :928–939.
- Mbikay, M., Grant, S. G., Sirois, F., Tadros, H., Skowronski, J., Lazure, C., Seidah, N. G., 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.
- McGuffin, L. J., Bryson, K., et Jones, D. T. (2000). The psipred protein structure prediction server. *Bioinformatics*, 16(4) :404–405.
- Medzhitov, R. et Janeway, C. A. J. (1999). Innate immune induction of the adaptive immune response. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 64 :429–435.
- Merrifield, R. B. (1965). Solid-phase peptide syntheses. *Endeavour*, 24 :3–7.
- Metchnikoff, E. (1905). *Immunity in infective diseases Immunity in infective diseases*. Macmillan Press, New York.
- Metz-Boutigue, M. H., 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.
- Metz-Boutigue, M. H., Goumon, Y., Lugardon, K., Strub, J. M., et Aunis, D. (1998). Antibacterial peptides are present in chromaffin cell secretory granules. *Cell Mol Neurobiol*, 18(2) :249–266.
- Metz-Boutigue, M. H., Goumon, Y., Strub, J. M., 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 :168–78.
- Metz-Boutigue, M. H., Kieffer, A. E., Goumon, Y., et Aunis, D. (2003b). Innate immunity : involvement of new neuropeptides. *Trends Microbiol*, 11(12) :585–592.
- Miyamasu, M., Misaki, Y., Izumi, S., Takaishi, T., Morita, Y., Nakamura, H., Matsushima, K., Kasahara, T., et Hirai, K. (1998). Glucocorticoids inhibit chemokine generation by human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*, 101(1 Pt 1) :75–83.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M., et Klionsky, D. J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature*, 451(7182) :1069–1075.
- Montero-Hadjadje, M., Vaingankar, S., Elias, S., Tostivint, H., Mahata, S. K., et Anouar, Y. (2008). Chromogranins a and b and secretogranin ii : Evolutionary and functional aspects. *Acta Physiol (Oxf)*, 192(2) :309–324.
- Mookherjee, N., Brown, K. L., Bowdish, D. M. E., Doria, S., Falsafi, R., Hokamp, K., Roche, F. M., Mu, R., Doho, G. H., Pistolic, J., Powers, J.-P., Bryan, J., Brinkman, F. S. L., et Hancock, R. E. W. (2006). Modulation of the tlr-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide ll-37. *J Immunol*, 176(4) :2455–2464.
- Mookherjee, N. et Hancock, R. E. W. (2007). Cationic host defence peptides : innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cell Mol Life Sci*, 64(7-8) :922–933.
- Morgan, B. P. (2000). The complement system : an overview. *Methods Mol Biol*, 150 :1–13.

- Morgan, B. P., Marchbank, K. J., Longhi, M. P., Harris, C. L., et Gallimore, A. M. (2005). Complement : central to innate immunity and bridging to adaptive responses. *Immunol Lett*, 97(2) :171–179.
- Morris, M. C., Depollier, J., Mery, J., Heitz, F., et Divita, G. (2001). A peptide carrier for the delivery of biologically active proteins into mammalian cells. *Nat Biotechnol*, 19(12) :1173–6.
- Morris, M. C., Vidal, P., Chaloin, L., Heitz, F., et Divita, G. (1997). A new peptide vector for efficient delivery of oligonucleotides into mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 25(14) :2730–6.
- Mukhopadhyay, D. et Riezman, H. (2007). Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*, 315(5809) :201–5.
- Mygind, P. H., Fischer, R. L., Schnorr, K. M., Hansen, M. T., Sönksen, C. P., Ludvigsen, S., Raventós, D., Buskov, S., Christensen, B., De Maria, L., Taboureau, O., Yaver, D., Elvig-Jørgensen, S. G., Sørensen, M. V., Christensen, B. E., Kjaerulff, S., Frimodt-Møller, N., Lehrer, R. I., Zasloff, M., et Kristensen, H.-H. (2005). Plectasin is a peptide antibiotic with therapeutic potential from a saprophytic fungus. *Nature*, 437(7061) :975–80.
- Nagai, Y., Shimazu, R., Ogata, H., Akashi, S., Sudo, K., Yamasaki, H., Hayashi, S.-I., Iwakura, Y., Kimoto, M., et Miyake, K. (2002). Requirement for md-1 in cell surface expression of rp105/cd180 and b-cell responsiveness to lipopolysaccharide. *Blood*, 99(5) :1699–1705.
- Nagaoka, I., Tamura, H., et Hirata, M. (2006). An antimicrobial cathelicidin peptide, human cap18/ll-37, suppresses neutrophil apoptosis via the activation of formyl-peptide receptor-like 1 and p2x7. *J Immunol*, 176(5) :3044–52.
- Nakamura, M. et Tanigawa, Y. (2003). Characterization of ubiquitin-like polypeptide acceptor protein, a novel pro-apoptotic member of the bcl2 family. *Eur J Biochem*, 270(20) :4052–8.
- Nakano, I., Funakoshi, A., Miyasaka, K., Ishida, K., Makk, G., Angwin, P., Chang, D., et Tatemoto, K. (1989). Isolation and characterization of bovine pancreastatin. *Regul Pept*, 25(2) :207–13.
- Niidome, T., Mihara, H., Oka, M., Hayashi, T., Saiki, T., Yoshida, K., et Aoyagi, H. (1998). Structure and property of model peptides of proline/arginine-rich region in bactenecin 5. *J Pept Res*, 51(5) :337–45.
- Niyonsaba, F., Ushio, H., Nagaoka, I., Okumura, K., et Ogawa, H. (2005). The human beta-defensins (-1, -2, -3, -4) and cathelicidin ll-37 induce il-18 secretion through p38 and erk mapk activation in primary human keratinocytes. *J Immunol*, 175(3) :1776–84.
- Nordahl, E. A., Rydengård, V., Nyberg, P., Nitsche, D. P., Mörgelin, M., Malmsten, M., Björck, L., et Schmidtchen, A. (2004). Activation of the complement system generates antibacterial peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(48) :16879–16884.
- Oberbeck, R., Schmitz, D., Wilsenack, K., Schüler, M., Pehle, B., Schedlowski, M., et Exton, M. S. (2004). Adrenergic modulation of survival and cellular immune functions during polymicrobial sepsis. *Neuroimmunomodulation*, 11(4) :214–223.
- O'Connor, D. T., Cadman, P. E., Smiley, C., Salem, R. M., Rao, F., Smith, J., Funk, S. D., Mahata, S. K., Mahata, M., Wen, G., Taupenot, L., Gonzalez-Yanes, C., Harper, K. L., Henry, R. R., et Sanchez-Margalet, V. (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) :5414–25.

- Oehlke, J., Scheller, A., Wiesner, B., Krause, E., Beyermann, M., Klauschenz, E., Melzig, M., et Bienert, M. (1998). Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim Biophys Acta*, 1414(1-2) :127–39.
- Ohsumi, Y. (2001). Molecular dissection of autophagy : two ubiquitin-like systems. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(3) :211–6.
- Orr, D. F., Chen, T., Johnsen, A. H., Chalk, R., Buchanan, K. D., Sloan, J. M., Rao, P., et Shaw, C. (2002). The spectrum of endogenous human chromogranin a-derived peptides identified using a modified proteomic strategy. *Proteomics*, 2(11) :1586–600.
- Ostberg, N. et Kaznessis, Y. (2005). Protegrin structure-activity relationships : using homology models of synthetic sequences to determine structural characteristics important for activity. *Peptides*, 26(2) :197–206.
- Ottiger, H. P., Battenberg, E. F., Tsou, A. P., Bloom, F. E., et Sutcliffe, J. G. (1990). 1b1075 : a brain- and pituitary-specific mrna that encodes a novel chromogranin/secretogranin-like component of intracellular vesicles. *J Neurosci*, 10(9) :3135–47.
- Ozkan, E., Yu, H., et Deisenhofer, J. (2005). Mechanistic insight into the allosteric activation of a ubiquitin-conjugating enzyme by ring-type ubiquitin ligases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(52) :18890–5.
- Palfrey, H. C. et Artalejo, C. R. (2003). Secretion : kiss and run caught on film. *Curr Biol*, 13(10) :R397–9.
- Palm, C., Netzereab, S., et Hällbrink, M. (2006). Quantitatively determined uptake of cell-penetrating peptides in non-mammalian cells with an evaluation of degradation and antimicrobial effects. *Peptides*, 27(7) :1710–6.
- Papanicolaou, D. A., Tsigos, C., Oldfield, E. H., et Chrousos, G. P. (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.
- Papo, N. et Shai, Y. (2005). Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. *Cell Mol Life Sci*, 62(7-8) :784–90.
- Park, C. B., Kim, H. S., et 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(1) :253–257.
- Park, Y., Jang, S.-H., Lee, D. G., et Hahm, K.-S. (2004). Antinematodal effect of antimicrobial peptide, pmap-23, isolated from porcine myeloid against caenorhabditis elegans. *J Pept Sci*, 10(5) :304–11.
- Pasare, C. et Medzhitov, R. (2005). Control of b-cell responses by toll-like receptors. *Nature*, 438(7066) :364–368.
- Pasupuleti, M., Walse, B., Nordahl, E. A., Mörgelin, M., Malmsten, M., et Schmidtchen, A. (2007). Preservation of antimicrobial properties of complement peptide c3a, from invertebrates to humans. *J Biol Chem*, 282(4) :2520–2528.

- Payan-Carreira, R., Rodrigues, P., et Carvalho, P. R. F. (2006). Chromogranin-a expression in the bovine testis. *Anim Reprod Sci*, 96(1-2) :146–53.
- Perrin, A. J., Jiang, X., Birmingham, C. L., So, N. S. Y., et Brumell, J. H. (2004). Recognition of bacteria in the cytosol of mammalian cells by the ubiquitin system. *Curr Biol*, 14(9) :806–11.
- Peschel, A., Jack, R. W., Otto, M., Collins, L. V., Staubitz, P., Nicholson, G., Kalbacher, H., Nieuwenhuizen, W. F., Jung, G., Tarkowski, A., van Kessel, K. P., et van Strijp, J. A. (2001). Staphylococcus aureus resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor mprf is based on modification of membrane lipids with l-lysine. *J Exp Med*, 193(9) :1067–76.
- Peschel, A., Otto, M., Jack, R. W., Kalbacher, H., Jung, G., et Götz, F. (1999). Inactivation of the dlt operon in staphylococcus aureus confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides. *J Biol Chem*, 274(13) :8405–10.
- Pickart, C. M. et Cohen, R. E. (2004). Proteasomes and their kin : proteases in the machine age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5(3) :177–87.
- Pooga, M., Hällbrink, M., Zorko, M., et Langel, U. (1998). Cell penetration by transportan. *FASEB J*, 12(1) :67–77.
- Pütsep, K., Carlsson, G., Boman, H. G., et Andersson, M. (2002). Deficiency of antibacterial peptides in patients with morbus kostmann : an observation study. *Lancet*, 360(9340) :1144–9.
- Rabel, D., Charlet, M., Ehret-Sabatier, L., Cavicchioli, L., Cudic, M., Otvos, L. J., et Bulet, P. (2004). Primary structure and in vitro antibacterial properties of the drosophila melanogaster attacin c pro-domain. *J Biol Chem*, 279(15) :14853–9.
- Radek, K. et Gallo, R. (2007). Antimicrobial peptides : natural effectors of the innate immune system. *Semin Immunopathol*, 29(1) :27–43.
- Radek, K. A., Lopez-Garcia, B., Hupe, M., Niesman, I. R., Elias, P. M., Taupenot, L., Mahata, S. K., O'Connor, D. T., et Gallo, R. L. (2008). The neuroendocrine peptide catestatin is a cutaneous antimicrobial and induced in the skin after injury. *J Invest Dermatol*.
- Rescigno, M., Citterio, S., Thèry, C., Rittig, M., Medaglini, D., Pozzi, G., Amigorena, S., et Ricciardi-Castagnoli, P. (1998). Bacteria-induced neo-biosynthesis, stabilization, and surface expression of functional class i molecules in mouse dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(9) :5229–5234.
- Robinson, W. E. J., McDougall, B., Tran, D., et Selsted, M. E. (1998). Anti-hiv-1 activity of indolicidin, an antimicrobial peptide from neutrophils. *J Leukoc Biol*, 63(1) :94–100.
- Romeo, D., Skerlavaj, B., Bolognesi, M., et Gennaro, R. (1988). Structure and bactericidal activity of an antibiotic dodecapeptide purified from bovine neutrophils. *J Biol Chem*, 263(20) :9573–5.
- Rossi, L. M., Rangasamy, P., Zhang, J., Qiu, X.-Q., et Wu, G. Y. (2008). Research advances in the development of peptide antibiotics. *J Pharm Sci*, 97(3) :1060–70.
- Rothbard, J. B., Garlington, S., Lin, Q., Kirschberg, T., Kreider, E., McGrane, P. L., Wender, P. A., et Khavari, P. A. (2000). Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin a facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nat Med*, 6(11) :1253–7.

- Rozek, A., Powers, J.-P. S., Friedrich, C. L., et Hancock, R. E. W. (2003). Structure-based design of an indolicidin peptide analogue with increased protease stability. *Biochemistry*, 42(48) :14130–8.
- Rubinsztein, D. C., Gestwicki, J. E., Murphy, L. O., et Klionsky, D. J. (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov*, 6(4) :304–312.
- Rytkönen, A., Poh, J., Garmendia, J., Boyle, C., Thompson, A., Liu, M., Freemont, P., Hinton, J. C. D., et Holden, D. W. (2007). Ssel, a salmonella deubiquitinase required for macrophage killing and virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(9) :3502–7.
- Salzet, M. et Verger-Bocquet, M. (2002). Cellular localization of a chromogranin b-like derived peptides in leeches. *Neuro Endocrinol Lett*, 23(3) :209–12.
- Salzman, R. A., Koiwa, H., Ibeas, J. I., Pardo, J. M., Hasegawa, P. M., et Bressan, R. A. (2004). Inorganic cations mediate plant pr5 protein antifungal activity through fungal mnn1- and mnn4-regulated cell surface glycans. *Mol Plant Microbe Interact*, 17(7) :780–8.
- Saruta, J., Tsukinoki, K., Sasaguri, K., Ishii, H., Yasuda, M., Osamura, Y. R., Watanabe, Y., et Sato, S. (2005). Expression and localization of chromogranin a gene and protein in human submandibular gland. *Cells Tissues Organs*, 180(4) :237–44.
- Schauber, J. et Gallo, R. L. (2008). Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J Allergy Clin Immunol*.
- Scheffner, M. et Whitaker, N. J. (2003). Human papillomavirus-induced carcinogenesis and the ubiquitin-proteasome system. *Semin Cancer Biol*, 13(1) :59–67.
- Scheinman, R. I., Gualberto, A., Jewell, C. M., Cidlowski, J. A., et Baldwin, A. S. J. (1995). Characterization of mechanisms involved in transrepression of nf-kappa b by activated glucocorticoid receptors. *Mol Cell Biol*, 15(2) :943–953.
- Schile, A. J., García-Fernández, M., et Steller, H. (2008). Regulation of apoptosis by xiap ubiquitin-ligase activity. *Genes Dev*, 22(16) :2256–66.
- Schimmel, A., Bräunling, O., Rütger, U., Huttner, W. B., et Gerdes, H. H. (1992). The organisation of the mouse secretogranin ii gene. *FEBS Lett*, 314(3) :375–80.
- Schmidt, M. C., Rothen-Rutishauser, B., Rist, B., Beck-Sickingher, A., Wunderli-Allenspach, H., Rubas, W., Sadée, W., et Merkle, H. P. (1998). Translocation of human calcitonin in respiratory nasal epithelium is associated with self-assembly in lipid membrane. *Biochemistry*, 37(47) :16582–90.
- Schröder, J. M. et Harder, J. (2006). Innate antimicrobial peptides in the skin. *Med Sci (Paris)*, 22(2) :153–157.
- Seidah, N. G., Hsi, K. L., 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) :525–34.
- Selye, H. (1941). Variations in organ size caused by chronic treatment with adrenal cortical compounds : An example of a dissociated adaptation to a hormone. *J Anat*, 76(Pt 1) :94–99.

- Shaw, J. E., Alattia, J.-R., Verity, J. E., Privé, G. G., et Yip, C. M. (2006). Mechanisms of antimicrobial peptide action : studies of indolicidin assembly at model membrane interfaces by in situ atomic force microscopy. *J Struct Biol*, 154(1) :42–58.
- Shenoy, S. K., McDonald, P. H., Kohout, T. A., et Lefkowitz, R. J. (2001). Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science*, 294(5545) :1307–13.
- Sieprawska-Lupa, M., Mydel, P., Krawczyk, K., Wójcik, K., Puklo, M., Lupa, B., Suder, P., Silberring, J., Reed, M., Pohl, J., Shafer, W., McAleese, F., Foster, T., Travis, J., et Potempa, J. (2004). Degradation of human antimicrobial peptide ll-37 by staphylococcus aureus-derived proteinases. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(12) :4673–4679.
- Sigismund, S., Woelk, T., Puri, C., Maspero, E., Tacchetti, C., Transidico, P., Di Fiore, P. P., et Polo, S. (2005). Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(8) :2760–5.
- Silverstein, A. M. (1989). *A History of Immunology*. Academic Press.
- Sinha, S., Cheshenko, N., Lehrer, R. I., et Herold, B. C. (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.
- Sivori, S., Falco, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Vitale, M., Moretta, L., et Moretta, A. (2004). Cpg and double-stranded rna trigger human nk cells by toll-like receptors : induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(27) :10116–10121.
- Smith, A. D. et Winkler, H. (1967). Purification and properties of an acidic protein from chromaffin granules of bovine adrenal medulla. *Biochem J*, 103(2) :483–492.
- Spillmann, D. (2001). Heparan sulfate : anchor for viral intruders ? *Biochimie*, 83(8) :811–7.
- Stark, M., Danielsson, O., Griffiths, W. J., 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) :357–67.
- Steiner, H., Hultmark, D., Engström, A., Bennich, H., et Boman, H. G. (1981). Sequence and specificity of two antibacterial proteins involved in insect immunity. *Nature*, 292(5820) :246–248.
- Sternberg, E. M. (2006). Neural regulation of innate immunity : a coordinated nonspecific host response to pathogens. *Nat Rev Immunol*, 6(4) :318–328.
- Straub, R. H., Mayer, M., Kreutz, M., Leeb, S., Schölmerich, J., et Falk, W. (2000). Neurotransmitters of the sympathetic nerve terminal are powerful chemoattractants for monocytes. *J Leukoc Biol*, 67(4) :553–558.
- Strøm, M. B., Haug, B. E., Rekdal, O., Skar, M. L., Stensen, W., et Svendsen, J. S. (2002). Important structural features of 15-residue lactoferricin derivatives and methods for improvement of antimicrobial activity. *Biochem Cell Biol*, 80(1) :65–74.

- Strous, G. J., dos Santos, C. A., Gent, J., Govers, R., Sachse, M., Schantl, J., et van Kerkhof, P. (2004). Ubiquitin system-dependent regulation of growth hormone receptor signal transduction. *Curr Top Microbiol Immunol*, 286 :81–118.
- Strub, J. M., Garcia-Sablone, P., Lonning, K., Taupenot, L., Hubert, P., Van Dorsselaer, A., Aunis, D., et 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(2) :356–368.
- Strub, J. M., Goumon, Y., Lugardon, K., Capon, C., Lopez, M., Moniatte, M., Van Dorsselaer, A., Aunis, D., et Metz-Boutigue, M. H. (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.
- Strub, J. M., Hubert, P., Nullans, G., Aunis, D., et Metz-Boutigue, M. H. (1996b). Antibacterial activity of secretolytin, a chromogranin b-derived peptide (614-626), is correlated with peptide structure. *FEBS Lett*, 379(3) :273–8.
- Strub, J. M., Sorokine, O., Van Dorsselaer, A., Aunis, D., et Metz-Boutigue, M. H. (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) :11928–36.
- Sun, L., Deng, L., Ea, C.-K., Xia, Z.-P., et Chen, Z. J. (2004). The traf6 ubiquitin ligase and tak1 kinase mediate ikk activation by bcl10 and malt1 in t lymphocytes. *Mol Cell*, 14(3) :289–301.
- Supp, D. M., Karpinski, A. C., et Boyce, S. T. (2004). Expression of human beta-defensins hbd-1, hbd-2, and hbd-3 in cultured keratinocytes and skin substitutes. *Burns*, 30(7) :643–8.
- Takehima, K., Chikushi, A., Lee, K.-K., Yonehara, S., et Matsuzaki, K. (2003). Translocation of analogues of the antimicrobial peptides magainin and buforin across human cell membranes. *J Biol Chem*, 278(2) :1310–5.
- Tasiemski, A., Hammad, H., Vandenbulcke, F., Breton, C., Bilfinger, T. J., Pestel, J., et Salzter, 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) :553–9.
- Tatemoto, K., Efendić, S., Mutt, V., Makk, G., Feistner, G. J., et Barchas, J. D. (1986). Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature*, 324(6096) :476–8.
- Taupenot, L., Harper, K. L., et O'Connor, D. T. (2003). The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med*, 348(12) :1134–49.
- Terrell, J., Shih, S., Dunn, R., et Hicke, L. (1998). A function for monoubiquitination in the internalization of a g protein-coupled receptor. *Mol Cell*, 1(2) :193–202.
- Thompson, A. R., Doelling, J. H., Suttangkakul, A., et Vierstra, R. D. (2005). Autophagic nutrient recycling in arabidopsis directed by the atg8 and atg12 conjugation pathways. *Plant Physiol*, 138(4) :2097–110.
- Thrower, E. C., Choe, C. U., So, S. H., Jeon, S. H., Ehrlich, B. E., et Yoo, S. H. (2003). A functional interaction between chromogranin b and the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/ca²⁺ channel. *J Biol Chem*, 278(50) :49699–706.

- Thrower, J. S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., et Pickart, C. M. (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J*, 19(1) :94–102.
- Tjabringa, G. S., Ninaber, D. K., Drijfhout, J. W., Rabe, K. F., et Hiemstra, P. S. (2006). Human cathelicidin ll-37 is a chemoattractant for eosinophils and neutrophils that acts via formyl-peptide receptors. *Int Arch Allergy Immunol*, 140(2) :103–112.
- Tokumaru, S., Sayama, K., Shirakata, Y., Komatsuzawa, H., Ouhara, K., Hanakawa, Y., Yahata, Y., Dai, X., Tohyama, M., Nagai, H., Yang, L., Higashiyama, S., Yoshimura, A., Sugai, M., et Hashimoto, K. (2005). Induction of keratinocyte migration via transactivation of the epidermal growth factor receptor by the antimicrobial peptide ll-37. *J Immunol*, 175(7) :4662–8.
- Tosi, M. F. (2005). Innate immune responses to infection. *J Allergy Clin Immunol*, 116(2) :241–9; quiz 250.
- Tota, B., Quintieri, A. M., Di Felice, V., et Cerra, M. C. (2007). New biological aspects of chromogranin a-derived peptides : focus on vasostatins. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 147(1) :11–8.
- 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.
- Trybala, E., Olofsson, S., Mårdberg, K., Svennerholm, B., Umemoto, K., Glorioso, J. C., et Bergström, T. (2004). Structural and functional features of the polycationic peptide required for inhibition of herpes simplex virus invasion of cells. *Antiviral Res*, 62(3) :125–34.
- Tsuda, Y., Takahashi, H., Kobayashi, M., Hanafusa, T., Herndon, D. N., et Suzuki, F. (2004). Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant staphylococcus aureus. *Immunity*, 21(2) :215–226.
- Ulrich, H. D. (2005). The rad6 pathway : control of dna damage bypass and mutagenesis by ubiquitin and sumo. *Chembiochem*, 6(10) :1735–43.
- Unsicker, K., Huber, K., Schütz, G., et Kalcheim, C. (2005). The chromaffin cell and its development. *Neurochem Res*, 30(6-7) :921–5.
- Urushitani, M., Sik, A., Sakurai, T., Nukina, N., Takahashi, R., et Julien, J.-P. (2006). Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Neurosci*, 9(1) :108–18.
- van der Poll, T., Jansen, J., Endert, E., Sauerwein, H. P., et van Deventer, S. J. (1994). Noradrenaline inhibits lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and interleukin 6 production in human whole blood. *Infect Immun*, 62(5) :2046–2050.
- Varadan, R., Assfalg, M., Haririnia, A., Raasi, S., Pickart, C., et Fushman, D. (2004). Solution conformation of lys63-linked di-ubiquitin chain provides clues to functional diversity of polyubiquitin signaling. *J Biol Chem*, 279(8) :7055–63.
- Varadan, R., Walker, O., Pickart, C., et Fushman, D. (2002). Structural properties of polyubiquitin chains in solution. *J Mol Biol*, 324(4) :637–47.

- Veiga, E. et Cossart, P. (2005). Ubiquitination of intracellular bacteria : a new bacteria-sensing system ? *Trends Cell Biol*, 15(1) :2–5.
- Vivès, E., Brodin, P., et Lebleu, B. (1997). A truncated hiv-1 tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*, 272(25) :16010–7.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., et Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*, 9(5) :503–510.
- Vora, P., Youdim, A., Thomas, L. S., Fukata, M., Tesfay, S. Y., Lukasek, K., Michelsen, K. S., Wada, A., Hirayama, T., Arditi, M., et Abreu, M. T. (2004). Beta-defensin-2 expression is regulated by tlr signaling in intestinal epithelial cells. *J Immunol*, 173(9) :5398–405.
- Wagner, C., Iking-Konert, C., Deneffeh, B., Stegmaier, S., Hug, F., et Hänsch, G. M. (2004). Granzyme b and perforin : constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood*, 103(3) :1099–1104.
- Waldbieser, G. C., Aimi, J., et Dixon, J. E. (1991). Cloning and characterization of the rat complementary deoxyribonucleic acid and gene encoding the neuroendocrine peptide 7b2. *Endocrinology*, 128(6) :3228–36.
- Wang, M., Cheng, D., Peng, J., et Pickart, C. M. (2006). Molecular determinants of polyubiquitin linkage selection by an hect ubiquitin ligase. *EMBO J*, 25(8) :1710–9.
- Wang, W., Cole, A. M., Hong, T., Waring, A. J., et Lehrer, R. I. (2003a). Retrocyclin, an antiretroviral theta-defensin, is a lectin. *J Immunol*, 170(9) :4708–16.
- Wang, X., Zhang, Z., Louboutin, J.-P., Moser, C., Weiner, D. J., et Wilson, J. M. (2003b). Airway epithelia regulate expression of human beta-defensin 2 through toll-like receptor 2. *FASEB J*, 17(12) :1727–9.
- Wang, Y., Griffiths, W. J., Jörnvall, H., Agerberth, B., et Johansson, J. (2002). Antibacterial peptides in stimulated human granulocytes : characterization of ubiquitinated histone h1a. *Eur J Biochem*, 269(2) :512–518.
- Wang, Z., Vandenberghe, I., Depreitere, J., Devreese, B., Clerens, S., Nouwen, E. J., 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) :235–42.
- Wegrzyn, J., Lee, J., Neveu, J. M., Lane, W. S., et Hook, V. (2007). Proteomics of neuroendocrine secretory vesicles reveal distinct functional systems for biosynthesis and exocytosis of peptide hormones and neurotransmitters. *J Proteome Res*, 6(5) :1652–1665.
- Wehkamp, J., Salzman, N. H., Porter, E., Nuding, S., Weichenthal, M., Petras, R. E., Shen, B., Schaeffeler, E., Schwab, M., Linzmeier, R., Feathers, R. W., Chu, H., Lima, H. J., Fellermann, K., Ganz, T., Stange, E. F., et Bevins, C. L. (2005). Reduced paneth cell alpha-defensins in ileal crohn's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(50) :18129–34.
- 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) :177–86.

- Wilkinson, C. R. M., Dittmar, G. A. G., Ohi, M. D., Uetz, P., Jones, N., et Finley, D. (2004). Ubiquitin-like protein hub1 is required for pre-mrna splicing and localization of an essential splicing factor in fission yeast. *Curr Biol*, 14(24) :2283–8.
- Winkler, H. (1993). The adrenal chromaffin granule : a model for large dense core vesicles of endocrine and nervous tissue. *J Anat*, 183 (Pt 2) :237–52.
- Winkler, H. et Fischer-Colbrie, R. (1992). The chromogranins a and b : the first 25 years and future perspectives. *Neuroscience*, 49(3) :497–528.
- 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) :241–54.
- Woltman, A. M., Massacrier, C., de Fijter, J. W., 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.
- Wu, H. J., Rozansky, D. J., Parmer, R. J., Gill, B. M., et O'Connor, D. T. (1991). Structure and function of the chromogranin a gene. clues to evolution and tissue-specific expression. *J Biol Chem*, 266(20) :13130–4.
- Wu, J.-T., Lin, H.-C., Hu, Y.-C., et Chien, C.-T. (2005). Neddylation and deneddylation regulate cull1 and cul3 protein accumulation. *Nat Cell Biol*, 7(10) :1014–20.
- Xirodimas, D. P., Saville, M. K., Bourdon, J.-C., Hay, R. T., et Lane, D. P. (2004). Mdm2-mediated nedd8 conjugation of p53 inhibits its transcriptional activity. *Cell*, 118(1) :83–97.
- Yang, D., Biragyn, A., Hoover, D. M., Lubkowski, J., et Oppenheim, J. J. (2004). Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol*, 22 :181–215.
- Yang, D., Chen, Q., Hoover, D. M., Staley, P., Tucker, K. D., Lubkowski, J., et Oppenheim, J. J. (2003). Many chemokines including ccl20/mip-3alpha display antimicrobial activity. *J Leukoc Biol*, 74(3) :448–455.
- Yang, D., Chen, Q., Schmidt, A. P., Anderson, G. M., Wang, J. M., Wooters, J., Oppenheim, J. J., et Chertov, O. (2000). LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (fpr1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and t cells. *J Exp Med*, 192(7) :1069–1074.
- Yang, D., Chertov, O., Bykovskaia, S. N., Chen, Q., Buffo, M. J., Shogan, J., Anderson, M., Schröder, J. M., Wang, J. M., Howard, O. M., et Oppenheim, J. J. (1999). Beta-defensins : linking innate and adaptive immunity through dendritic and t cell ccr6. *Science*, 286(5439) :525–528.
- Yasin, B., Wang, W., Pang, M., Cheshenko, N., Hong, T., Waring, A. J., Herold, B. C., Wagar, E. A., et Lehrer, R. I. (2004). Theta defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry. *J Virol*, 78(10) :5147–56.
- Yoo, S. H. (1992). Identification of the ca(2+)-dependent calmodulin-binding region of chromogranin a. *Biochemistry*, 31(26) :6134–40.

- Yoo, S. H. et Kang, Y. K. (1997). Identification of the secretory vesicle membrane binding region of chromogranin b. *FEBS Lett*, 406(3) :259–62.
- Yoo, S. H. et Lewis, M. S. (1992). Effects of pH and Ca^{2+} on monomer-dimer and monomer-tetramer equilibria of chromogranin a. *J Biol Chem*, 267(16) :11236–41.
- Yoo, S. H. et Lewis, M. S. (1993). Dimerization and tetramerization properties of the c-terminal region of chromogranin a : a thermodynamic analysis. *Biochemistry*, 32(34) :8816–22.
- Yoo, S. H., So, S. H., Kweon, H. S., Lee, J. S., Kang, M. K., et Jeon, C. J. (2000). Coupling of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and chromogranins a and b in secretory granules. *J Biol Chem*, 275(17) :12553–9.
- Yoshio, H., Tollin, M., Gudmundsson, G. H., Lagercrantz, H., Jornvall, H., Marchini, G., et Agerberth, B. (2003). Antimicrobial polypeptides of human vernix caseosa and amniotic fluid : implications for newborn innate defense. *Pediatr Res*, 53(2) :211–6.
- Young, P., Deveraux, Q., Beal, R. E., Pickart, C. M., et Rechsteiner, M. (1998). Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26 s protease subunit 5a. *J Biol Chem*, 273(10) :5461–7.
- Yount, N. Y., Andrés, M. T., Fierro, J. F., et Yeaman, M. R. (2007). The gamma-core motif correlates with antimicrobial activity in cysteine-containing kaliocin-1 originating from transferrins. *Biochim Biophys Acta*, 1768(11) :2862–72.
- Yount, N. Y., Bayer, A. S., Xiong, Y. Q., et Yeaman, M. R. (2006). Advances in antimicrobial peptide immunobiology. *Biopolymers*, 84(5) :435–458.
- Yount, N. Y. et Yeaman, M. R. (2004). Multidimensional signatures in antimicrobial peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(19) :7363–7368.
- Zaiou, M. (2007). Multifunctional antimicrobial peptides : therapeutic targets in several human diseases. *J Mol Med*, 85(4) :317–29.
- 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 U S A*, 84(15) :5449–5453.
- Zelezetsky, I., Pag, U., Sahl, H.-G., et Tossi, A. (2005). Tuning the biological properties of amphipathic alpha-helical antimicrobial peptides : rational use of minimal amino acid substitutions. *Peptides*, 26(12) :2368–76.
- Zhang, D. (2008). *The expression and role of chromogranin A and its derived peptides in septic patients*. PhD thesis, Université Louis Pasteur-Strasbourg 1.
- Zhao, C., Denison, C., Huibregtse, J. M., Gygi, S., et Krug, R. M. (2005). Human isg15 conjugation targets both ifn-induced and constitutively expressed proteins functioning in diverse cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(29) :10200–5.
- Zhou, H., Monack, D. M., Kayagaki, N., Wertz, I., Yin, J., Wolf, B., et Dixit, V. M. (2005). Yersinia virulence factor yopj acts as a deubiquitinase to inhibit nf-kappa b activation. *J Exp Med*, 202(10) :1327–32.

- Zhou, H., Wertz, I., O'Rourke, K., Ultsch, M., Seshagiri, S., Eby, M., Xiao, W., et Dixit, V. M. (2004). Bcl10 activates the nf-kappab pathway through ubiquitination of nemo. *Nature*, 427(6970) :167–71.
- Zhu, W. L., Hahm, K.-S., et Shin, S. Y. (2007). Cathelicidin-derived trp/pro-rich antimicrobial peptides with lysine peptoid residue (nlys) : therapeutic index and plausible mode of action. *J Pept Sci*, 13(8) :529–35.
- Zipfel, C. (2008). Pattern-recognition receptors in plant innate immunity. *Curr Opin Immunol*, 20(1) :10–16.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

The homologous rat chromogranin A1–64 (rCGA1–64) modulates myocardial and coronary function in rat heart to counteract adrenergic stimulation indirectly via endothelium-derived nitric oxide

M. C. CERRA, M. P. GALLO, T. ANGELONE, A. M. QUINTIERI, E. PULERA, E. FILICE, B. GUEROLD, P. SHOOSHTARIZADEH, R. LEVI, R. RAMELLA, A. BRERO, O. BOERO, M. H. METZ-BOUTIGUE, B. TOTA and G. ALLOATTI

The FASEB Journal, 2008, vol. 22, pages 3992-4004

Annexe 1 : pages 144-... :

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

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1096/fj.08-110239>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

Two Chromogranin A-Derived Peptides Induce Calcium Entry in Human Neutrophils by Calmodulin-Regulated Calcium Independent Phospholipase A2

Dan ZHANG, Peiman SHOOSHTARIZADEH, Benoît-Joseph LAVENTIE, Didier André COLIN, Jean-François CHICH, Jasmina VIDIC, Jean DE BARRY, Sylvette CHASSEROT-GOLAZ, François DELALANDE, Alain VAN DORSSELAER, Francis SCHNEIDER, Karen HELLE, Dominique AUNIS, Gilles PREVOST, Marie-Hélène METZ-BOUTIGUE

The Public Library of Science (PLoS), 2009, vol. 4, n°2 : e450, open access

Annexe 2 :

La publication présentée ici dans la thèse est accessible en accès libre sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004501>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

**Two peptides of chromogranin A induce calcium entry in human neutrophils by
activating calcium independent phospholipase A₂**

**Zhang Dan^{1,4,6}, Shooshtarizadeh Peiman¹, Laventie Benoît², Colin Didier André²,
de Barry Jean³, Chasserot-Golaz Sylvette³, Delalande François¹, Schneider
Francis⁴, Helle Karen⁵, Aunis Dominique¹, Prévost Gilles², Metz-Boutigue Marie-
Hélène^{1#}**

¹Inserm U575, Physiopathologie du Système Nerveux, Strasbourg, France

²EA 3432, Institut de Bactériologie, Université Louis Pasteur, Hôpitaux Universitaires
de Strasbourg, France.

³Institut des Neurosciences Cellulaires et Intégratives, UMR 7168 CNRS-Université
Louis Pasteur, Strasbourg, France

⁴Département de Réanimation Médicale, Hôpital de Hautepierre, Strasbourg, France

⁵Department of Biomedicine, University of Bergen, Bergen, Norway

⁶First Hospital, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing, China

[#]Corresponding author : Marie-Hélène Metz-Boutigue

Inserm U575, Physiopathologie du Système Nerveux, 5 rue Blaise Pascal 67084
Strasbourg, France ;

E-mail : metz@neurochem.u-strasbg.fr;

Tel : 33 3 88 45 66 09 ; Fax : 33 3 88 60 08 06.

Condensed title: CgA peptides induce Ca²⁺ entry

Introduction

Chromogranin A (CgA) is a well-studied member of the chromogranin/secretogranin family of proteins, present in secretory cells of the nervous, endocrine and immune systems [1] (for review). CgA was the first chromogranin to be characterized as an acidic protein co-stored and co-released with the catecholamine hormones from the chromaffin cells of the adrenal medulla. The discovery that pancreastatin, a CgA-derived peptide (bCGA₂₄₈₋₂₉₃) was able to inhibit the glucose-evoked insulin secretion from pancreatic beta-cells [2] initiated the concept of a prohormone function for this protein [3]. Until now, numerous endogenous cleavage products of CgA resulting to the proteolytic digestion by intragranular enzymes such as prohormone convertases PC1/3, PC2, neuroendocrine-specific carboxypeptidase E/H, Lys and Arg-aminopeptidases [4] have been identified in the intragranular matrix of chromaffin cells. This proteolytic processing of CgA is reported to occur at 13 sites [5] and among the resulting fragments several induce biological activities [1]. The *in vitro* activities of these CGA-derived peptides strongly suggest their participation in homeostatic processes such as calcium and glucose metabolisms [6], cardiovascular functions [7-10], inflammatory reactions [11,12], pain relief, tissue repair [13], gastrointestinal motility [14,15] and in the first line of defence against invading microorganisms [16-20]. During the last decade our group identified a range of antimicrobial peptides derived from the natural processing of chromogranin A and B, proenkephalin-A and ubiquitin, which all are co-secreted with catecholamines upon stimulation of chromaffin cells from the adrenal medulla [17,18,21-24]. These new antimicrobial peptides are integrated in the concept that the adrenal medulla plays an important role in innate immunity [25]. Moreover, when polymorphonuclear neutrophils (PMNs) accumulate at sites of inflammation and are stimulated by

lipopolysaccharide or other microbial agents, such as Panton-Valentine leukocidin (PVL) [26,27], these cells have emerged as a source of intact and processed forms of CgA, such as Vasostatin-I and -II (residues 1-76 and 1-113) [17] and Cateslytin (residues 344-358) [18], the N-terminal fragment of Catestatin (residues 344-364) [28]. Since PMNs are the central effector cells in innate immune responses to inflammatory stimuli, it is of great importance to understand the regulation of PMNs responses to external stimuli.

In the present study, we have decided to investigate the effects on PMNs of the two more potent antimicrobial CgA-derived peptides: Chromofungin (CHR, bovine CgA₄₇₋₆₆) [22] and Catestatin (CAT, bovine CgA₃₄₄₋₃₆₄) [18]. By using biochemistry, confocal microscopy, flow cytometry, calcium imaging and proteomic analyses we show that the two peptides provoke a transient Ca²⁺ entry independent of release from internal stores. The mechanisms by which these two peptides induce Ca²⁺ influx appear to involve calmodulin binding [22] and subsequent activation of the calcium-independent phospholipase A2 (iPLA₂) in the complex regulation of store-operated channels (SOCs) [29-33], terminating in exocytotic release of a range of PMN factors of importance.

Results

Since PMNs are central effectors in innate immune response to inflammatory stimuli, we investigated, on these cells, the effects induced by two highly conserved antimicrobial CgA derived peptides on these cells. CHR (RILSILRHQNLLKELQDLAL) which corresponds to the active antifungal domain CgA₄₇₋₆₆ of bovine Vasostatin-1 CgA₁₋₇₆ [22] and CAT (RSMRLSFRARGYGFRGPGQLQL) which corresponds to a potent antimicrobial peptide CgA₃₄₄₋₃₆₄ [18]. These two peptides display antimicrobial activities at the micromolar range.

CHR and CAT provoked Ca²⁺ entry in PMNs

While in the absence of extracellular Ca²⁺ the two peptides were unable to provoke a depletion of intracellular calcium stores in PMNs loaded with Fluo-3, in absence of extracellular Ca²⁺ we observed that, but a transient increase of intracellular Ca²⁺ concentration was induced by CHR (20 µM) and CAT (20 µM) when 1 mM free Ca²⁺ was present (Figure 1A) thus suggesting that Ca²⁺ concentration increase was due to a Ca²⁺ influx. In order to show the specificity of CHR and CAT in the entry of extracellular Ca²⁺, several other CgA-derived peptides (20 µM) were comparatively tested. First, three peptides included in the N-terminal CgA domain were unable to display antimicrobial activities: CgA₄₋₁₆ (NSPMNKGDTVEVMK), the disulfide loop CgA₁₇₋₄₀ (CIVEVISDTLSKPSPMPVSKEC) and the natural peptide previously reported CgA₆₅₋₇₆ (ALQGAKERTHQQ) [5] (Figure 1A). Second step, the role of the positive charge of the median lysine residue of CHR (RILSILRHQNLL K₅₉*ELQDLAL) was examined by testing the peptide with a Boc (*tert*-Butyloxycarbonyl) modified lysine residue. This peptide is unable to induce the entry of Ca²⁺ in PMNs (Figure 1A). Then, the mixtures of peptides resulting from the tryptic digest of CHR (R, ILSILR, HQNLLK, ELQDLAL)

and CAT (SSM K, LSFR, ARAYGFR, GPQPQL) were tested. For each of these latter assays, no Ca^{2+} influx was observed, indicating the importance of the complete peptides for the Ca^{2+} influx (Figure 1A). Finally we tested a CAT scrambled peptide showing that the sequence and not the composition is crucial for the Ca^{2+} entry.

We also observed that 5-200 μM CHR and CAT induce a Ca^{2+} influx in Fluo3-loaded PMNs in a concentration-dependent manner (Figure 1B, C). Interestingly, the simultaneous addition of 50 μM CHR and 50 μM CAT provoked a higher Ca^{2+} increase than those obtained with separated peptides, suggesting that both two peptides may have a synergic effect for Ca^{2+} entry in PMNs (Figure 1C).

A significant immediate increase of activated PMNs was observed after 15 s application of 50 μM CHR or 50 μM CAT (M1/M2) (Figure 2A). With different concentrations of CHR or CAT (0-200 μM), the percentage of activated PMNs was related to the peptide concentrations, reaching maxima of 45% (50 μM CHR) and 60% (50 μM CAT) respectively (Figure 2B).

Ca^{2+} entry evoked by CHR and CAT via Ca^{2+} selective SOCs

To determine a possible pathway for Ca^{2+} entry induced by CHR and CAT in PMNs, cells were pretreated during 2 min by 100 μM 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB), the specific blocker of store-operated channels (SOCs). It completely blocked the entry of extracellular Ca^{2+} by 20 μM CHR or 20 μM CAT (Figure 3A and 3B), indicating that the two peptides were involved in the activation of Store Operated Calcium Entry (SOCE) through SOCs. Thereafter, Ca^{2+} entry in response to CHR and CAT was compared with that induced by the arachidonic acid (AA) through the arachidonic-regulated channels (ARCs). AA used at 50 μM induced a 2-APB-insensitive calcium influx, but that is more sensitive to the Ca^{2+} channel blocker

Gadolinium chloride (Gd^{3+}) than those obtained for CHR or CAT (Figure 3A-C). These experiments indicate that Ca^{2+} entry induced by the two CgA-derived peptides was pharmacologically distinct to that induced by AA.

Finally, in response to 20 μM CHR and 20 μM CAT, the specificity of the entry of Ca^{2+} (1 mM $CaCl_2$), by comparison with Mn^{2+} (0.2 mM $MnCl_2$), into PMNs loaded with Fura-2, was examined at the corresponding wavelengths of excitation ($\lambda_{ex340nm}$ and $\lambda_{ex360nm}$). For the two peptides, no evidence for Mn^{2+} entry was observed (Figure 4A) in accordance to the Ca^{2+} selectivity of Mn^{2+} non-permeable SOCs on PMNs [34].

Calmodulin binding properties of CHR and CAT

In agreement with a first observation [35] we previously reported that the antifungal CgA-peptide CHR inhibits the (CaM)-regulated calcineurin (CaN) activity [22], interestingly, the two cationic sequences CHR and CAT may be aligned with two Ca^{2+} -dependent CaM binding motifs 1-8-14 B and 1-5-10 [36] (Figure 5A). Therefore, it was crucial to demonstrate the entry of CHR and CAT into the PMNs. By using confocal microscopy the interaction of rhodamine-labeled CHR and CAT (20 μM) with isolated PMNs was investigated (Figure 5B). Rhodamine-labeled peptides were detected in the cytoplasm after 2 min incubation. As a control, the rhodamine-labeled inactive peptide, the Hippocampal Cholinergic Neurostimulating Peptide (HCNP) was undetectable in PMNs, indicating the specificity of the entry of rhodamine-labeled CHR and CAT. Finally, using a CaN activity assay *in vitro* CHR and CAT inhibit CaM-regulated CaN phosphatase activity in a concentration-dependent manner (Figure 5C). At 50 μM , CHR and CAT inhibited the phosphatase activity in a comparable extent by 45% and 50% respectively (Figure 5C).

Role of iPLA₂ in the Ca²⁺ entry evoked by CHR and CAT

Previous studies have demonstrated that functional iPLA₂ is involved in activation of SOCs from different cell types [29] by the displacement of inhibitory calmodulin (CaM) from iPLA₂, the iPLA₂ activation and the generation of lysophospholipids to activate SOCs [30]. Confocal microscopy confirmed the presence of iPLA₂ in PMNs (Figure 6A). After subcellular fractionation and Triton X-100 treatment, Western blot indicated that iPLA₂ was associated with the cell membranes, according to a previous study [30] (Figure 6B). The stimulatory role of 20 μM CHR and 20 μM CAT in the enzymatic activity mechanism of iPLA₂ in PMNs was then examined. This experiment showed that these two peptides act similarly as two CaM inhibitors: calmidazolium (CMZ) and N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W7) (Figure 6C). Interestingly, a comparison of CHR and CAT sequences with two CaM-binding peptides of iPLA₂ reveals significant homology (Figure 6D). The CHR sequence is aligned with the 1-9-14 motif of iPLA₂ (618-635) and the CAT sequence with two CaM-binding peptide of iPLA₂ (618-635 and 691-709) [37].

Direct activation of SOCs via iPLA₂ by CHR and CAT

CAT and CHR didn't evoke a Ca²⁺ mobilization from intracellular stores before Ca²⁺ entry from extracellular medium (addition Ca²⁺ in medium), but they act similarly as 1 μM CMZ and 100 μM W7, the CaM inhibitors, (Figure 7).

BEL, a specific inhibitor of iPLA₂ and the bromophenacyl bromide (BPB), an inhibitor of PLA₂ were compared with 2-APB for effects on peptide inducing Ca²⁺ influx (Figure 7A, B). BEL and BPB, similarly to 2-APB abolished the transient Ca²⁺ entry induced by 20 μM CHR and 20 μM CAT. The two CaM antagonists W7 and CMZ (Figure 7C, D) induced a longer lasting rise in influx but interestingly, BEL, BPB and 2-APB had

similar effects on the Ca^{2+} entry induced by W7 and CMZ as those of CHR and CAT. Our experiments indicate that Ca^{2+} entry provoked by CHR and CAT process from a similar manner than CMZ and W7, two inhibitors of CaM, (Figure 7C, D). Previous studies showed that CMZ and some CaM inhibitory peptides may directly activate SOCs without the release of intracellular Ca^{2+} stores [38-40].

Proteomic analysis of the PMNs secretions released after stimulation by CHR and CAT

PMNs secretions obtained after treatment with 20 μM CHR and 20 μM CAT were chromatographed by HPLC (Figure 8A, B). Fractions isolated from CHR and CAT stimulations (CHR1-7 and CAT1-5, respectively) were identified by NanoLC-MS/MS analysis. Among the list of identified proteins, we recorted factors involved in innate immunity and others participating in cell metabolism modifications (Figure 8C).

After stimulation of PMNs with 20 μM CHR, immunoblotting revealed a weak detection of Vasostatin-1 and a CAT-included fragment corresponding to CGA₃₄₀₋₃₉₅ as previously reported [18]. Furthermore, after stimulation by 20 μM CAT, we detected several CAT-including peptides with molecular weights in the range 15-70 kDa (data not shown). The major fragment corresponding to 15-17 kDa, corresponds to CGA₃₄₀₋₃₉₅ a CAT-containing peptide as previously reported [18].

Discussion

Ajouter :

22. Lugardon K, Chasserot-Golaz S, Kieffer AE, Maget-Dana R, Nullans G, et al. (2001) Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A-(47-66)-derived peptide. *J Biol Chem* 276: 35875-35882.

Et Kang S, Kang J Yoo SH and Park S 2007 *J of Peptide Sci* 13: 237-244.

A rapid and effective response to challenge pathogens is essential for the survival of all living organisms. Among the different mechanisms that have evolved to act efficiently, the production of a large variety of natural antimicrobial peptides has increased attracting attention. Natural cationic host defense peptides represent lead molecules that boost innate immune responses and selectively modulate pathogen-induced inflammatory responses [41].

CHR and CAT are two antimicrobial peptides derived from the natural processing of CgA. CHR (CgA₄₇₋₆₆) corresponds to the antimicrobial domain of the N-terminal fragment Vasostatin-I [1], and we recently identified a new natural fragment starting at position 47 by using HPLC and sequencing. It is now well established that CAT corresponds to a natural peptide [42]. These two peptides are highly conserved during evolution and display various biological functions [1]. To date only CAT has been reported to act *via* the nicotinic acetylcholine receptor [28]. Several sized membrane binding proteins in the 70-80 kDa range [43,44] were proposed for Vasostatin-I (CgA₁₋₇₆). Furthermore, the sequences of CHR and CAT may also be aligned with Penetratin (Figure 9), suggesting the possibility for these peptides to be new members of the Cell Penetrating Peptides (CPPs) family, as others antimicrobial peptides [45] with positive charge and amphipathic characteristics..

CHR and CAT are stored in secretory granules of chromaffin cells and PMNs in a larger form, which may be processed extracellularly into the mature active peptides [17,18]. They result to the processing of CgA by numerous intragranular enzymes

such as prohormone convertases (PC1 and 2), aminopeptidases, carboxypeptidases, by kallikrein located at the outer membrane level and by circulatory proteolytic enzymes such as plasmin and thrombin. In addition, during infection it is well known that some bacterial virulence factors are proteolytic enzymes (*i.e.*, Glu-C protease from *Staphylococcus aureus*) and might continue the natural processing of CgA to generate the CHR and CAT fragments [17,18].

Calcium ions are universal secondary messengers that are key players in many cellular signal transduction pathways, which regulate diverse functions such as secretion, cell motility, proliferation and cell death. Increase in intracellular calcium comes mainly from two sources: internal stores that release calcium and channels in the plasma membrane that open to allow calcium influx into the cell. In PMNs, calcium signaling has been involved in oxidase activation, cell degranulation and priming response to a wide variety of proinflammatory molecules.

In contact with PMNs the two peptides, CHR and CAT, penetrate very quickly (Figure 5B) and interact with CaM to activate iPLA₂ (Figures 5C, 6C). Displacement of CaM leads to iPLA₂ activation and production of lysophospholipids inducing the opening of SOCs [30], the entry of Ca²⁺ (Figure 1) and the release of innate immune factors (Figure 8). In addition to our data showing the ability of CHR and CAT to inhibit the CaN activity (Figure 5C), in a recent study the interaction of CHR with CaM was clearly demonstrated [46].

The molecular mechanism of the SOCE pathway remains one of the most intriguing and long lasting mysteries of Ca²⁺ signaling [39]. The main question concerns the signal origin: how the depletion of the internal Ca²⁺ store activates the Ca²⁺ entry through the SOC in the plasma membrane? [39,47]. The Calcium Influx Factor (CIF), a specific factor produced by the cells following depletion of Ca²⁺ stores [48],

corresponds to the diffusible messenger that is produced by Ca^{2+} stores upon their depletion and which travels to the plasma membrane to activate SOCs and Ca^{2+} entry [39]. The mechanism of SOCs by CIF includes the displacement of CaM from the complex with iPLA₂ (the key event), the activation of iPLA₂, the formation of lysophospholipids and the opening of SOCs [29,30,39]. These authors demonstrated that SOCs are activated by displacement of inhibitory CaM from iPLA₂ independently of store depletion. Thus, CaM inhibitors (chemical substances and peptides) may activate SOCs, by leaking the interaction CaM-iPLA₂ [30,39]. In the present study we showed that CHR and CAT induce 2-APB significant Ca^{2+} entry without depletion of Ca^{2+} store in a similar manner than CaM inhibitors.

For CAT, an inhibitory peptide that may represent a novel autocrine homeostatic mechanism controlling catecholamine release from chromaffin cells (Figure 9) and noradrenergic neurons is noteworthy [28]. CAT blocked entry of Ca^{2+} from the extracellular space into the cytoplasm, but only when such entry was triggered by nicotinic stimulation and not when triggered by membrane depolarization, which opens calcium channels at a signal transduction signal step distal to nicotinic stimulation.

For the first time, we propose that two CgA antimicrobial peptides (CHR and CAT), released during stress and infection, may play a role of immunomodulators inducing the PMNs activation. A considerable number of studies showed that the neuroendocrine and immune systems communicate each other to promote reciprocal regulations in the host. Immune cells can sense pathogens and secrete proteins that modify neuroendocrine cells. Alternatively, factors secreted by the neuroendocrine system can bring about changes in the immune cell activity [25].

Substance P and the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) are

two neuropeptides stored and released by chromaffin granules. Substance P, another neuroimmunomodulator, inhibits nicotinic cholinergic-stimulated catecholamine release, but CAT displays a higher potency than does substance P [49].

PACAP is a peptide, which displays numerous functions in both cells of neuronal and non neuronal origin and previous studies shown that PMNs possess functional VIP/PACAP receptors which mediate after PACAP interaction Ca^{2+} -dependent proinflammatory activities through the activation of multiple regulatory pathways [50]. These data indicate that both extracellular and intracellular Ca^{2+} play key roles in PACAP proinflammatory activities [51]. In addition, it has been reported that in contrast to CAT, PACAP induced increase of Ca^{2+} entry and catecholamine release in bovine chromaffin cells. A previous study demonstrated that PACAP is coupled with an unique Ca^{2+} entry pathway distinct from nAChR, VOCs and SOCs [52]. Interestingly, in contrast to the PACAP action, for the peptide CAT a retroactive loop may control the proinflammatory activity for the CAT peptide.

Finally, the data reported here are important to complete the involvement of CgA in innate immunity and the crucial role of adrenal medulla in the cross-talk between the neuroendocrine and immune systems. All together, the immunomodulatory activities of CHR and CAT are important for the design of pharmacological strategies to maintain homeostasis during infections.

Materials and Methods

Peptide synthesis

All the synthetic peptides were prepared on an Applied Biosystems 433A peptide synthesizer (Foster City, USA), using the stepwise solid-phase approach with 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) chemistry. Then, the synthetic peptides were purified by RP-HPLC on a Macherey Nagel Nucleosil RP 300-7C18 column (10 × 250 mm; particle size 7 µm and pore size 100 nm). Rhodamine fluorophore 5(6)-carboxytetramethyl rhodamine was conjugated with peptides at the N-terminal extremity, as previously described [22]. Synthetic peptides were analyzed by mass spectrometry and automated Edman sequencing on an Applied Sequencing System (Applied Biosystems, Foster City, USA) [5]. MALDI mass measurements were carried out on an Ultraflex™ TOF/TOF (Bruker Daltonics, USA) to perform a rapid control of synthetic peptides according to the procedure previously reported [53].

Cells and Flow cytometry measurements

Human PMNs were prepared from buffy coat from healthy donors, isolated by a Ficoll-metrizoate gradient (Seromed, Berlin, Germany), and followed by dextran (6% (w/v) sedimentation [54].

PMNs were suspended at a concentration of $5 \cdot 10^5$ cells/mL in EGTA buffer consisting of 10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM glucose, 0.1 mM EGTA, pH 7.3. Measurements from 3000 PMNs were carried out using a FacSort® flow cytometer (Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France) equipped with a 15 mW argon laser tuned to 488 nm [55].

We evaluated the intracellular calcium, using flow cytometry of cells previously loaded with 5 µM Fluo-3 (Molecular Probes, New Brunswick, USA). The increase of

Fluo-3 fluorescence was measured with different CgA-derived peptides in absence or after addition of 1.1 mM extracellular CaCl_2 [56]. Fluo-3 fluorescence was measured from the fluorescence light 1 (FL1: $\lambda_{\text{Em}} = 530 \text{ nm}$) using Cell Quest Pro™ software (Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France). Data provided are the average of more than three independent experiments of different cell preparations.

Time-lapse intracellular Ca^{2+} imaging

PMNs were incubated for 30 min at 37°C in HEPES-buffered Krebs medium (130 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 1.2 mM MgSO_4 , 2.5 mM CaCl_2 , 11 mM D-glucose, 10 mM HEPES, pH 7.4) containing 2 μM Fura-2-AM. Cells were then washed with HEPES-buffered Krebs medium and subsequently incubated for 20 min to allow Fura-2-AM hydrolysis. After three additional washes the cells were placed onto an inverted microscope (Axiovert 35M Zeiss, Germany), superfused with Krebs solution (1 mL/min), and alternatively illuminated at $350 \pm 10 \text{ nm}$ and $380 \pm 10 \text{ nm}$. The fluorescent emissions were observed using a long pass filter at 510 nm. For each excitation wavelength and each 2 s an image pair was recorded using a CCD camera (ImageEM™, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan) and fluorescence ratio images were subsequently calculated subsequently using Metafluor™ software (Molecular Devices, Downingtown, USA).

Spectrofluorometry determination

PMNs (density?) were loaded with Fura-2 (concentration, temperature, time?) as above and washed in EGTA buffer with 1.1 mM CaCl_2 added. Continuous variations of fluorescence intensities were recorded using a dual excitations and dual emissions spectrofluorometer Deltascan (Bioritek, PTI, Chamarande, France) with slits set at 4

nm. One ml of PMNs ($4 \cdot 10^6$ cells/mL) was added to 1 mL of the assay solution under constant stirring in a 4 ml cuvette (1 cm light path) thermostated at 37 °C. Wavelengths were settled at 340 nm and 360 nm for excitation, and 510 nm for emission. Data were expressed in arbitrary units.

Confocal microscopy analysis of rhodamine-labelled peptide loaded PMNs

PMNs ($1 \cdot 10^6$ /mL) were incubated 2 min in room temperature (RT) with rhodamine-labelled peptides (20 μ M) in Phosphate Buffered Saline consisting of 10.5 mM KH_2PO_4 , 30 mM Na_2HPO_4 , 0.154 M NaCl, pH 7.4, washed and subsequently centrifuged by cytopins of $1\text{-}2 \cdot 10^5$ isolated PMNs onto glass slides (*fournisseur?* 300 rpm, 10 min, RT). Cytopins were fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde in PBS at RT for 20 min, then incubated with Draq-5 (dilution 1:500, Biostatus Limited., Leicestershire, UK) for 15 min. Stained cells were monitored with a Zeiss LSM 510 laser scanning microscope (Zeiss, Jena, Germany) equipped with a Planapo oil immersion objective ($\times 63$, numerical aperture 1.4).

Calcineurin activity assay

Calcineurin phosphatase activity was measured by using the calcineurin assay (Biomol, Plymouth Meeting, USA). Rat brain cells (as a source of calcineurin) were lysed and centrifuged at $100,000 \times g$ for 45 min at 4°C and free phosphates were removed from supernatant by a desalting column according to the manufacturer's instructions. After addition of different peptides concentrations, calcineurin phosphate activity was spectrophotometrically measured by detecting at 620 nm free-phosphates released from a synthetic phosphopeptide substrate in the presence or absence of EGTA. Data were obtained from two similar experiments, each performed

in triplicates.

Immunocytochemistry of iPLA₂ in PMNs

Cytospins were prepared by centrifugation of $1-2 \cdot 10^5$ isolated PMNs onto glass slides (300 rpm, 10 min), then fixed with 4% (v/v) paraformaldehyde in PBS, at RT for 20 min, permeabilized with PBS containing 1% (v/v) Triton X-100 (Sigma, St. Louis, USA) at RT for 30 min, and blocked by incubation in PBS containing 0.25% (w/v) bovine serum albumin. Subsequently, cytopins were incubated with primary antibodies anti-iPLA₂ polyclonal antibody (dilution 1:100, Cayman chemical, Ann Arbor, USA) for 1 h at 37°C. Cytospins were washed with PBS, then incubated with secondary antibodies Alexa 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG (dilution 1:2000, Molecular Probes, Carlsbad, USA) for 45 min at 37°C and finally incubated with Draq-5 (dilution 1:500 fournisseur?) for 15 min. Immunofluorescence staining was monitored with a Zeiss LSM 510 laser scanning microscope equipped with a Planapo oil immersion objective ($\times 63$, numerical aperture 1.4).

Detection of iPLA₂ in PMNs and iPLA₂ activity assay

Subcellular fractionation of PMNs

PMNs ($5 \cdot 10^7$ /mL) were sonicated (10 W) in the absence or presence of 1% Triton X-100, in the buffer contained 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5, and 1 mM phenylmethsulphonyl fluoride for 3 times of 10 s with 15 s break between cycles, then spun down at $10,000 \times g$ for 15 min at 4°C. The pellet containing membranes was collected and the supernatant was further centrifuged at $100,000 \times g$ for 60 min at 4°C [40]. The amount of proteins contained in membrane and cytoplasm fractions was determined by Bradford method, and the two preparations were stored at -20°C for later use.

Gel electrophoresis and Western-blot analysis of iPLA₂ in PMNs

Fifty µg proteins of each sample were separated on 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis SDS-PAGE gradient gels (SDS-PAGE) and electrotransferred onto polyvinylidene difluorene membranes (GE Healthcare Bioscience). iPLA₂ were detected with a polyclonal anti-iPLA₂ (dilution 1:500, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA), and signal was developed using goat antirabbit IgG conjugated to peroxidase (dilution 1:50,000, Jackson ImmunoResearch Laboratories, Baltimore Pike, USA) to determine immunoreactivity [57].

iPLA₂ activity assay

PMNs ($3 \cdot 10^8$ cells/mL) were collected, sonicated 3 times for 10 s with 15 s break between cycles, and centrifuged at $15,000 \times g$ for 20 min at 4°C. The supernatant was removed and kept on ice. After determination of the protein concentration (Bradford assay), iPLA₂ activity measurement was obtained in presence of different peptide concentrations using the cPLA₂ assay kit, according to the modified method previously reported (cPLA₂ assay kit, Cayman chemical), [30]. Results were from two similar experiments, each performed in triplicates.

Characterization of secretions obtained after stimulation of PMNs by CHR and CAT

Stimulation and purification

PMNs secretory products were obtained after stimulation of ($1 \cdot 10^8$ cells/mL) PMNs with 20 µM CHR or 20 µM CAT in EGTA buffer for 20 min. PMNs were centrifuged at $800 \times g$ for 10 min at 4 °C and the supernatant was recovered. Desalting and

elimination of low molecular weights protein were achieved by centrifugation with a molecular cut-off 3 kDa Centricon (Pall, New York, USA), then the material was stored at -20°C for further analyses.

PMNs secretions induced by CHR and CAT were purified using a DIONEX Dual Gradient system (Dionex, Sunnyvale, USA) and a Nucleosil RP300–5C18 column (4 × 250 mm, 5 µm particle size, 300-Å porosity; 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 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid in 70% (v/v) acetonitrile-water (solvent B). Gradient was indicated on chromatograms and fractions of 700 µl were collected.

Mass spectrometry analysis

The RP-HPLC fractions proteins were digested with 40 µL of 12.5 ng/µL of modified porcine trypsin (Promega, Madison, WI, USA) in 25 mM NH₄HCO₃ at 37°C for 14 h. The generated peptides were analyzed directly by NanoLC-MS/MS on an Agilent 1100 Series HPLC-Chip/MS system (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) coupled to an HCT Ultra ion trap (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). The voltage applied to the capillary cap was optimized to -1850 V. For tandem MS experiments, the system was operated with automatic switching between MS and MS/MS modes. The three most abundant peptides, preferring doubly charged ions, were selected on each MS spectrum for further isolation and fragmentation. The MS/MS scanning was performed in the ultrascan resolution mode at a scan rate of 26.000m/z per second. A total of 6 scans were averaged to obtain a MS/MS spectrum. The complete system was fully controlled by ChemStation (Agilent Technologies) and EsquireControl (Bruker Daltonics) software. Mass data collected during nanoLC-MS/MS analysis

were processed before interpretation using a local Mascot™ (Matrix Science, London, UK) server. The searches were performed against the NCBI database [58].

Drugs

Bromo-enol Lactone (BEL), Thapsigargin (TG), Calmidazolium (CMZ), Bromophenacyl bromide (BPB), 2-Aminoethyl diphenylborinate (2-APB), N-6-aminohexyl-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide (W7), Arachidonic acid (AA) and Rhodamine fluorophore, 5(6)-carboxytetramethyl rhodamine were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA).

Statistical analysis

Group data are presented as mean \pm SD (as specified in the text and figure legends). Student's t test was used to determine the significance of data (*), $p < 0.05$.

Acknowledgments

This work was supported by Inserm, EA 3432, University Louis Pasteur Strasbourg Odontology faculty (grant for PS), BRAHMS (grant for PS) and the Transplantaion Fondation (grant for DZ). We are grateful to Raymonde Girardot (EA 3432, Faculté de Médecine, Strasbourg) for expert technical assistance in neutrophils preparation and flow cytometry measurements. We thank Bernard Guérold (Inserm U575, Strasbourg) for his excellent technical expertise in peptide synthesis.

References

1. Helle KB, Corti A, Metz-Boutigue MH, Tota B (2007) The endocrine role for chromogranin A: a prohormone for peptides with regulatory properties. *Cell Mol Life Sci* 64: 2863-2886.
2. Tatemoto K, Efendic S, Mutt V, Makk G, Feistner GJ, et al. (1986) Pancreastatin, a novel pancreatic peptide that inhibits insulin secretion. *Nature* 324: 476-478.
3. Eiden LE (1987) Is chromogranin a prohormone? *Nature* 325: 301.
4. Seidah NG, Chretien M (1999) Proprotein and prohormone convertases: a family of subtilases generating diverse bioactive polypeptides. *Brain Res* 848: 45-62.
5. Metz-Boutigue MH, 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.
6. Koeslag JH, Saunders PT, Wessels JA (1999) The chromogranins and the counter-regulatory hormones: do they make homeostatic sense? *J Physiol* 517 (Pt 3): 643-649.
7. Aardal S, Helle KB (1992) The vasoinhibitory activity of bovine chromogranin A fragment (vasostatin) and its independence of extracellular calcium in isolated segments of human blood vessels. *Regul Pept* 41: 9-18.
8. Brekke JF, Osol GJ, Helle KB (2002) N-terminal chromogranin-derived peptides as dilators of bovine coronary resistance arteries. *Regul Pept* 105: 93-100.
9. Corti A, Mannarino C, Mazza R, Angelone T, Longhi R, et al. (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: 217-224.
10. Tota B, Mazza R, Angelone T, Nullans G, Metz-Boutigue MH, et al. (2003) Peptides from the N-terminal domain of chromogranin A (vasostatins) exert negative inotropic effects in the isolated frog heart. *Regul Pept* 114: 123-130.
11. Ferrero E, Scabini S, Magni E, Foglieni C, Belloni D, et al. (2004) Chromogranin A protects vessels against tumor necrosis factor alpha-induced vascular leakage. *Faseb J* 18: 554-556.
12. Blois A, Srebro B, Mandala M, Corti A, Helle KB, et al. (2006) The chromogranin A peptide vasostatin-I inhibits gap formation and signal transduction mediated by inflammatory agents in cultured bovine pulmonary and coronary arterial endothelial cells. *Regul Pept* 135: 78-84.
13. Gasparri A, Sidoli A, Sanchez LP, Longhi R, Siccardi AG, et al. (1997) Chromogranin A fragments modulate cell adhesion. Identification and characterization of a pro-adhesive domain. *J Biol Chem* 272: 20835-20843.
14. Ghia JE, Pradaud I, Crenner F, Metz-Boutigue MH, Aunis D, et al. (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: 27-35.
15. Amato A, Corti A, Serio R, Mule F (2005) Inhibitory influence of chromogranin A N-terminal fragment (vasostatin-1) on the spontaneous contractions of rat proximal colon. *Regul Pept* 130: 42-47.
16. Metz-Boutigue MH, Goumon Y, Lugardon K, Strub JM, Aunis D (1998) Antibacterial peptides are present in chromaffin cell secretory granules. *Cell Mol Neurobiol* 18: 249-266.
17. Lugardon K, Raffner R, Goumon Y, Corti A, Delmas A, et al. (2000) Antibacterial and antifungal activities of vasostatin-1, the N-terminal fragment of chromogranin A. *J Biol Chem* 275: 10745-10753.
18. Briolat J, Wu SD, Mahata SK, Gonthier B, Bagnard D, et al. (2005) New antimicrobial activity for the catecholamine release-inhibitory peptide from chromogranin A. *Cell Mol Life Sci* 62: 377-385.
19. Taupenot L, Harper KL, O'Connor DT (2003) The chromogranin-secretogranin family. *N Engl J Med* 348: 1134-1149.
20. Zhang K, Rao F, Wen G, Salem RM, Vaingankar S, et al. (2006) Catecholamine storage vesicles and the metabolic syndrome: The role of the chromogranin A fragment pancreastatin. *Diabetes Obes Metab* 8: 621-633.
21. Strub JM, Garcia-Sablone P, Lonning K, Taupenot L, Hubert P, et al. (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.
22. Lugardon K, Chasserot-Golaz S, Kieffer AE, Maget-Dana R, Nullans G, et al. (2001) Structural and biological characterization of chromofungin, the antifungal chromogranin A-(47-66)-derived peptide. *J Biol Chem* 276: 35875-35882.
23. Goumon Y, Strub JM, Moniatte M, Nullans G, Poteur L, et al. (1996) The C-terminal bisphosphorylated proenkephalin-A-(209-237)-peptide from adrenal medullary chromaffin granules possesses antibacterial activity. *Eur J Biochem* 235: 516-525.
24. Kieffer AE, Goumon Y, Ruh O, Chasserot-Golaz S, Nullans G, et al. (2003) The N- and C-terminal fragments of ubiquitin are important for the antimicrobial activities. *Faseb J* 17: 776-778.
25. Sternberg EM (2006) Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to

- pathogens. *Nat Rev Immunol* 6: 318-328.
26. Joubert O, Viero G, Keller D, Martinez E, Colin DA, et al. (2006) Engineered covalent leucotoxin heterodimers form functional pores: insights into S-F interactions. *Biochem J* 396: 381-389.
 27. Genestier AL, Michallet MC, Prevost G, Bellot G, Chalabreysse L, et al. (2005) *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils. *J Clin Invest* 115: 3117-3127.
 28. Mahata SK, O'Connor DT, Mahata M, Yoo SH, Taupenot L, et al. (1997) Novel autocrine feedback control of catecholamine release. A discrete chromogranin a fragment is a noncompetitive nicotinic cholinergic antagonist. *J Clin Invest* 100: 1623-1633.
 29. Smani T, Zakharov SI, Leno E, Csutora P, Trepakova ES, et al. (2003) Ca²⁺-independent phospholipase A2 is a novel determinant of store-operated Ca²⁺ entry. *J Biol Chem* 278: 11909-11915.
 30. Smani T, Zakharov SI, Csutora P, Leno E, Trepakova ES, et al. (2004) A novel mechanism for the store-operated calcium influx pathway. *Nat Cell Biol* 6: 113-120.
 31. Parekh AB, Putney JW, Jr. (2005) Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* 85: 757-810.
 32. Lohr C, Deitmer JW (2006) Calcium signaling in invertebrate glial cells. *Glia* 54: 642-649.
 33. Balsinde J, Balboa MA (2005) Cellular regulation and proposed biological functions of group VIA calcium-independent phospholipase A2 in activated cells. *Cell Signal* 17: 1052-1062.
 34. Itagaki K, Kannan KB, Livingston DH, Deitch EA, Fekete Z, et al. (2002) Store-operated calcium entry in human neutrophils reflects multiple contributions from independently regulated pathways. *J Immunol* 168: 4063-4069.
 35. Yoo SH (1992) Identification of the Ca(2+)-dependent calmodulin-binding region of chromogranin A. *Biochemistry* 31: 6134-6140.
 36. Rhoads AR, Friedberg F (1997) Sequence motifs for calmodulin recognition. *Faseb J* 11: 331-340.
 37. Jenkins CM, Wolf MJ, Mancuso DJ, Gross RW (2001) Identification of the calmodulin-binding domain of recombinant calcium-independent phospholipase A2beta. implications for structure and function. *J Biol Chem* 276: 7129-7135.
 38. Bolotina VM (2004) Store-operated channels: diversity and activation mechanisms. *Sci STKE* 2004: pe34.
 39. Bolotina VM, Csutora P (2005) CIF and other mysteries of the store-operated Ca²⁺-entry pathway. *Trends Biochem Sci* 30: 378-387.
 40. Csutora P, Zarayskiy V, Peter K, Monje F, Smani T, et al. (2006) Activation mechanism for CRAC current and store-operated Ca²⁺ entry: calcium influx factor and Ca²⁺-independent phospholipase A2beta-mediated pathway. *J Biol Chem* 281: 34926-34935.
 41. Mookherjee N, Hancock RE (2007) Cationic host defence peptides: innate immune regulatory peptides as a novel approach for treating infections. *Cell Mol Life Sci* 64: 922-933.
 42. Radek K, Gallo R (2007) Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system. *Semin Immunopathol* 29: 27-43.
 43. Angeletti RH, Aardal S, Serck-Hanssen G, Gee P, Helle KB (1994) Vasoinhibitory activity of synthetic peptides from the amino terminus of chromogranin A. *Acta Physiol Scand* 152: 11-19.
 44. Russell J, Gee P, Liu SM, Angeletti RH (1994) Inhibition of parathyroid hormone secretion by amino-terminal chromogranin peptides. *Endocrinology* 135: 337-342.
 45. Henriques ST, Melo MN, Castanho MA (2006) Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: how different are they? *Biochem J* 399: 1-7.
 46. Kang J, Kang S, Yoo SH, Park S (2007) Identification of residues participating in the interaction between an intraluminal loop of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and a conserved N-terminal region of chromogranin B. *Biochim Biophys Acta* 1774: 502-509.
 47. Lewis RS (2007) The molecular choreography of a store-operated calcium channel. *Nature* 446: 284-287.
 48. Randriamampita C, Tsien RY (1993) Emptying of intracellular Ca²⁺ stores releases a novel small messenger that stimulates Ca²⁺ influx. *Nature* 364: 809-814.
 49. Cheung NS, Karlsson P, Wang JX, Bienert M, Oehme P, et al. (1994) Functional studies with substance P analogues: effects of N-terminal, C-terminal, and C-terminus-extended analogues of substance P on nicotine-induced secretion and desensitization in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J Neurochem* 62: 2246-2253.
 50. Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Yon L, Fournier A, et al. (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacol Rev* 52: 269-324.
 51. Harfi I, Corazza F, D'Hondt S, Sariban E (2005) Differential calcium regulation of proinflammatory activities in human neutrophils exposed to the neuropeptide pituitary adenylate cyclase-activating protein. *J Immunol* 175: 4091-4102.
 52. Morita K, Sakakibara A, Kitayama S, Kumagai K, Tanne K, et al. (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces a sustained increase in intracellular free Ca(2+) concentration and catechol amine release by activating Ca(2+) influx via receptor-stimulated Ca(2+) entry, independent of

- store-operated Ca(2+) channels, and voltage-dependent Ca(2+) channels in bovine adrenal medullary chromaffin cells. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 972-982.
53. Gevaert K, Vandekerckhove J (2000) Protein identification methods in proteomics. *Electrophoresis* 21: 1145-1154.
54. Colin DA, Mazurier I, Sire S, Finck-Barbancon V (1994) Interaction of the two components of leukocidin from *Staphylococcus aureus* with human polymorphonuclear leukocyte membranes: sequential binding and subsequent activation. *Infect Immun* 62: 3184-3188.
55. Meunier O, Falkenrodt A, Monteil H, Colin DA (1995) Application of flow cytometry in toxinology: pathophysiology of human polymorphonuclear leukocytes damaged by a pore-forming toxin from *Staphylococcus aureus*. *Cytometry* 21: 241-247.
56. Baba Moussa L, Werner S, Colin DA, Mourey L, Pedelacq JD, et al. (1999) Decoupling the Ca(2+)-activation from the pore-forming function of the bi-component Pantone-Valentine leucocidin in human PMNs. *FEBS Lett* 461: 280-286.
57. Muller A, Glattard E, Taleb O, Kemmel V, Laux A, et al. (2008) Endogenous morphine in SH-SY5Y cells and the mouse cerebellum. *PLoS ONE* 3: e1641.
58. Delalande F, Carapito C, Brizard JP, Brugidou C, Van Dorsselaer A (2005) Multigenic families and proteomics: extended protein characterization as a tool for paralog gene identification. *Proteomics* 5: 450-460.

Figure Legends

Figure 1: Ca²⁺ influx evoked in human PMNs by CGA-derived peptides.

For flow cytometry analysis, PMNs ($5 \cdot 10^5$ cells/ml) were loaded with Fluo-3AM probe (5 μ M) and its fluorescence intensity of Fluo-3 was monitored at $\lambda_{Em530\text{ nm}}$. Traces were obtained from 3000 PMNs and are averaged from triplicates at least. Peptides were added in the Ca²⁺-free EGTA buffer (time 0), and 1.1 mM CaCl₂ was added 620 s latter.

A) Time course variations of the intracellular Ca²⁺ in human PMNs in response to 20 μ M CAT and 20 μ M CHR, compared with other CGA-derived peptides (20 μ M CGA₄₋₁₆, CGA₁₇₋₄₀ and CGA₆₅₋₇₆), tryptic digests of 20 μ M CAT and CHR and modified CHR (without K₅₉). Ca²⁺ entry induced specifically by 20 μ M CAT and 20 μ M CHR in PMNs is depicted.

B, C) Time course variations of the intracellular Ca²⁺ in human PMNs in response to increasing concentrations (1 μ M, 5 μ M, 20 μ M, 50 μ M and 200 μ M) of CHR (**B**), CAT (**C**) or a mixture of 50 μ M CAT and 50 μ M CHR (**C**).

Figure 2: Dose-dependent Ca²⁺-influx after stimulation of human PMNs by CHR and CAT.

A) Representative diagrams of flow cytometry determination of the Ca²⁺ influx in human PMNs population as basic and activated influxes in M1 and M2 windows, respectively. These influxes were obtained 15 s after the addition of 50 μ M CHR and 50 μ M CAT to PMNs. PMNs at t = 0 are indicated in grey, PMNs concerned by Ca²⁺ influx correspond to the M2 population.

B) Flow cytometry determination of the percentage of PMNs populations in M2

windows to total initial PMNs, after 15 s exposure with increasing concentrations of CHR or CAT (1, 5, 20, 50, 200 μM).

Figure 3: Ca^{2+} influx induced by 20 μM CHR and 20 μM CAT in PMNs and comparison with that of 50 μM arachidonic acid (AA).

Time-lapse intracellular calcium imaging was performed on cells loaded with 1 μM Fura-2-AM and then further treated with 20 μM CHR, 20 μM CAT and 50 μM (AA) in HEPES--buffered Krebs medium in presence of 2.5 mM CaCl_2 .

A-C) Left panel, representative traces showing average change in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ($F_{340\text{nm}}/F_{380\text{nm}}$) recorded in the ratio mode in individual PMNs loaded with Fura-2. The arrow indicates the time of addition of 20 μM CHR, 20 μM CAT and 50 μM AA. In the different assays, 100 μM 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB), and 1 μM gadolinium chloride (Gd^{3+}) were applied 2 min before addition of peptides. Traces are averaged from triplicates.

Right panel, summary data corresponding to the left panel. They show the maximal Ca^{2+} influx (Ratio \pm S.E.) obtained with different conditions (indicated below); n, indicates the number of PMNs used for each experiment; *, indicate significant differences ($p < 0.05$) obtained after treatment with 20 μM CHR, 20 μM CAT and 50 μM AA.

Figure 4: Specificity of the Ca^{2+} entry provoked by 50 μM CHR and 20 μM CAT.

Characterization by spectrofluorimetry of the specificity of the Ca^{2+} entry provoked by 50 μM CHR and 20 μM CAT into human PMNs, by comparison with Mn^{2+} entry.

Simultaneous recordings of fluorescent intensity variations of PMNs loaded with Fura-2 at $\lambda_{\text{Ex}340 \text{ nm}}$ (a) and $\lambda_{\text{Ex}360 \text{ nm}}$ (b) in the presence of 1 mM CaCl_2 and 0.2 mM

MnCl₂. Divalent cations and peptides were added as indicated by arrows. Recordings are representative of three experiments.

Figure 5: Interaction of CHR and CAT with calmodulin.

A) Alignment of the CHR and CAT sequences with 2 calmodulin binding motifs 1-8-14 B and 1-5-10. The alignment has been obtained manually so that hydrophobic residues occupy invariant positions shown with boldface letters. The positive charge is also indicated.

B) Fluorescence confocal microscopy of PMNs after incubation during 120 s with 20 μM rhodamine-labeled peptides (Rho-CHR and Rho-CAT). A negative control is obtained with 20 μM rhodamine labeled hippocampal cholinergic neurostimulating peptide (Rho-HCNP). The PMNs nuclei were labeled with Draq-5.

C) Calcineurin phosphatase activity in the presence of CHR and CAT. The calcineurin phosphatase activity was evaluated using the BIOMOL GREEN™ calcineurin (CaN) assay kit. Phosphatase activity was obtained by detection of free phosphate based on the malachite green assay at $\lambda_{620 \text{ nm}}$. The bar represents the calculated results of subtraction of CaN activity in the absence of EGTA from the activity in presence of EGTA and the data correspond to average value \pm S.E.; *, denotes significant differences ($p < 0.05$) between peptide treatments and control (without peptide).

Figure 6: CHR and CAT stimulate iPLA2 activity.

A) Fluorescence confocal microscopy of PMNs: left, PMNs were only treated with Alexa Fluo 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG (dilution 1:2000); right, PMNs were stained with primary antibody anti-iPLA₂ polyclonal and secondary antibody Alexa

Fluo 488 conjugated donkey anti-rabbit IgG.

B) Western-blot analysis: the presence of a 82 kDa protein corresponding to iPLA₂ was detected in the membrane fraction issued from PMNs. Comparable signal was obtained from cytoplasmic fraction when membranes were treated with 0.1% Triton X-100.

C) iPLA₂ activity assay: Stimulation of iPLA₂ activity after treatment during 37°C at 30 min by 20 μM CHR and 20 μM CAT and comparison with the effects of two calmodulin-binding factors (1μM CMZ, 50 μM W7) and one iPLA₂ inhibitor (25 μM BEL). Activity of iPLA₂ is presented as (Abs/mg of protein), with Abs corresponding to the absorbance at $\lambda_{405 \text{ nm}}$. Results were from two similar experiments, each performed in triplicate and the data presented as mean \pm S.E. *, denote significant increase ($p < 0.05$).

Figure 7: Involvement of iPLA₂ in the mechanism of the Ca²⁺ entry provoked by CHR and CAT in PMNs.

A-D) Left panel: Effects of blocker of SOC (100 μM 2-APB) and inhibitors of iPLA₂ (25 μM BEL) PLA₂ (10 μM BPB) on Ca²⁺ entry provoked by 20 μM CHR, 20 μM CAT and calmodulin (CaM) antagonists (30 μM W7 and 1 μM CMZ). The representative traces show the average change in intracellular Ca²⁺ concentration (Fura-2 ratio, F_{340}/F_{380}) recorded simultaneously in a number of individual PMNs. The arrows indicate the time of addition of peptides or CaM antagonists. 25 μM BEL, 10 μM BPB and 100 μM 2-APB were added at 37°C respectively 30 min, 10 min and 2 min before the peptides or CaM antagonists; Results are obtained from at least three different independent experiments.

Right panel: bars represent the maximum Ca²⁺ influx (Ratio \pm S.E.) in different

treatments (indicated below each bar); n, indicates the number of PMNs used for each experiment; *, denotes significant difference ($p < 0.05$) between specific treatments and control.

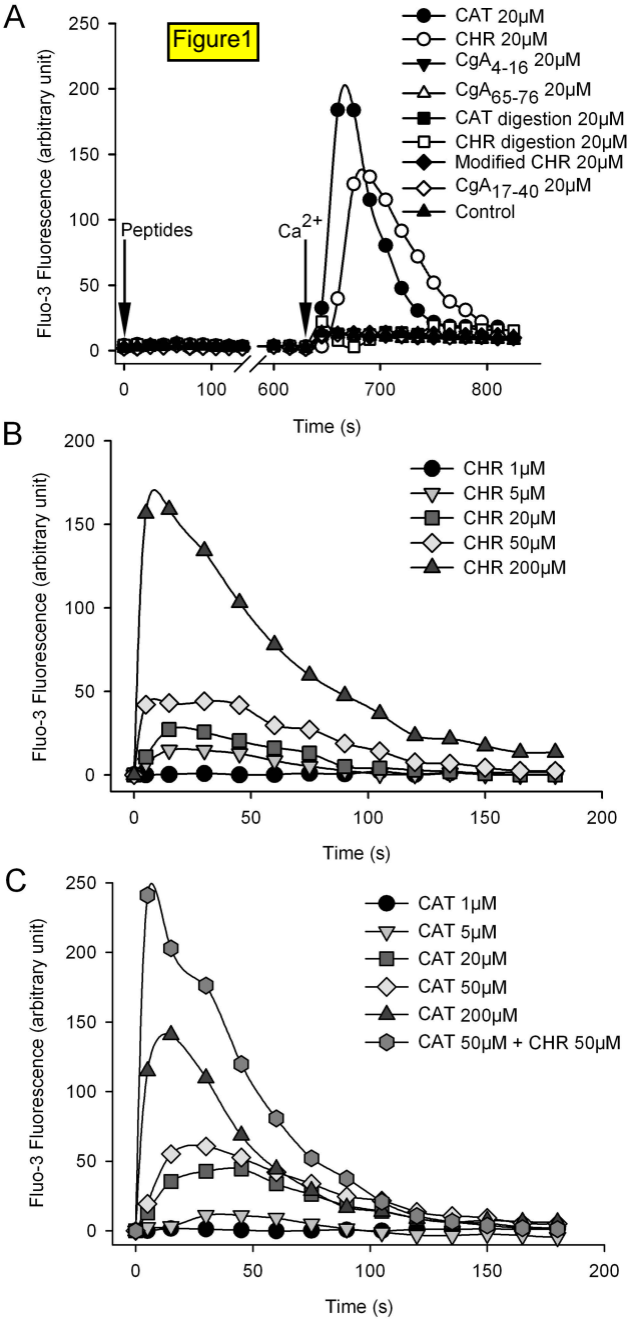
Figure 8: Identification of proteins released in PMNs secretions induced by 20 μM CHR and 20 μM CAT and implicated in innate immunity.

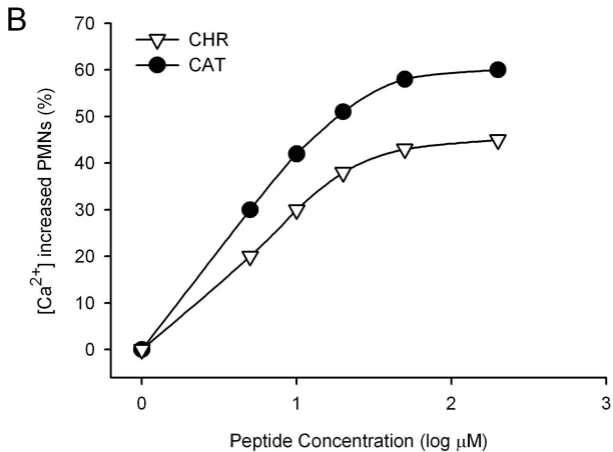
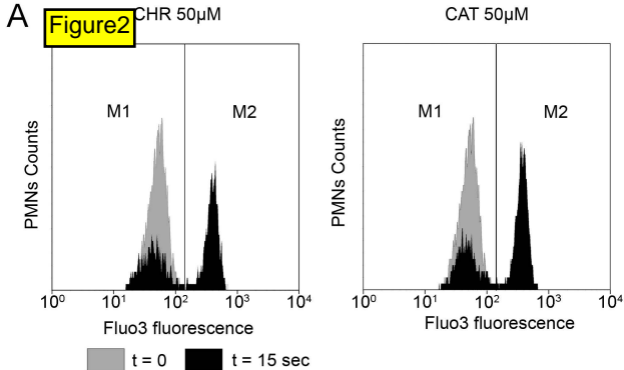
A, B) RP-HPLC purification with a Macherey Nagel reverse-phase C18 column (4 x 250 mm; particle size 5 μm and pore size 100 nm) of PMNs ($1 \cdot 10^8$ cells) secretion induced by 20 μM CHR (**A**) and 20 μM CAT (**B**). Numbers indicate the collected fractions containing proteins involved in innate immunity.

(C) Proteomic identification by NanoLC-MS/MS analysis of secretions of PMNs (number) obtained after incubation of PMNs with 20 μM CHR and 20 μM CAT during 30 min.

Figure 9: Model for the action of the chromogranin A derived peptides CHR and CAT on PMNs activation.

The alignment of the two sequences CHR and CAT with Penetratin is presented. Stress and infection correspond to two different pathways as indicated by a (black) and b (grey) respectively. The negative feedback induced by CAT on nicotinic cholinergic receptor of chromaffin cell is also indicated. P, CHR or CAT; P', CAT; CPP, cell penetrating peptide; CaM, calmodulin; iPLA₂, calcium independent phospholipase A₂; LysoPL, lysophospholipids; LysoPL; GC, Golgi complex; PVL, Pantan-Valentine leukocidin; R, receptor.





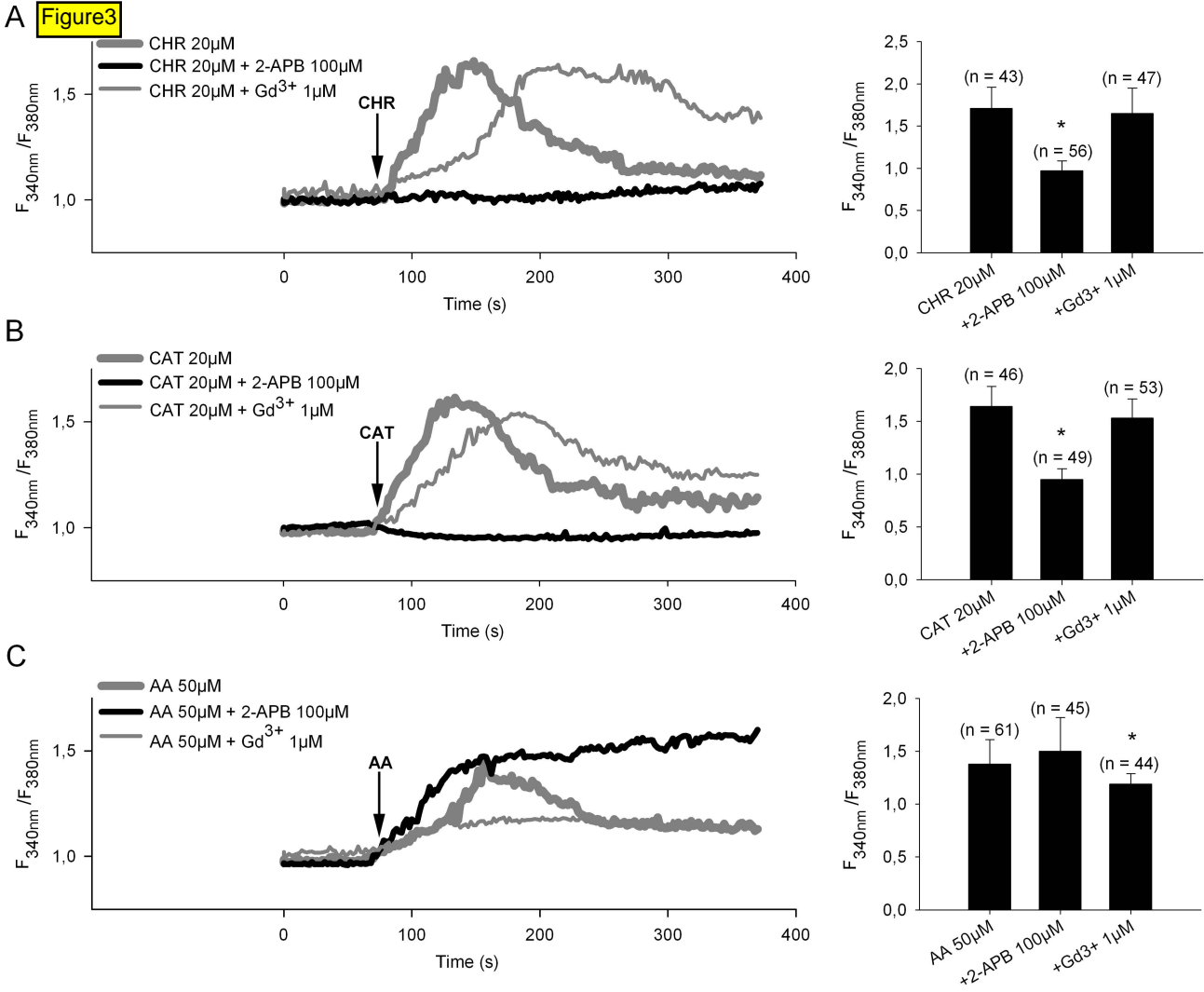
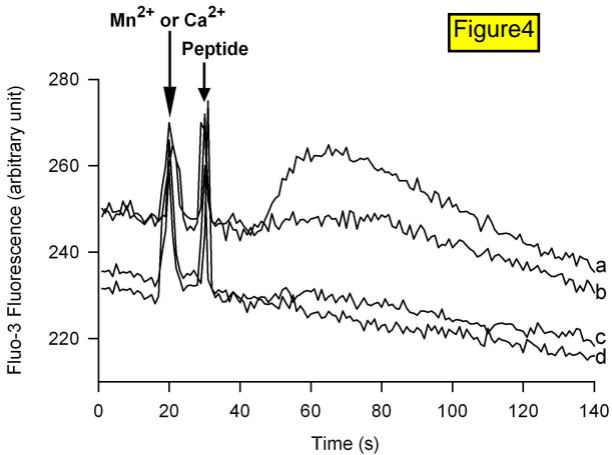


Figure4



A

Type	Peptide	Motif	Charge
1-8-14 B		(FILW) XXXXXX (FAILVW) XXXXX (FILVW)	
	CHR	RILS I LRHQNL L KELQD L	1.5+
1-5-10		XXXX (FILVW) XXX (FAILV) XXXX (FILVW)	
	CAT	RSMR L SFR A RGYG F	4+

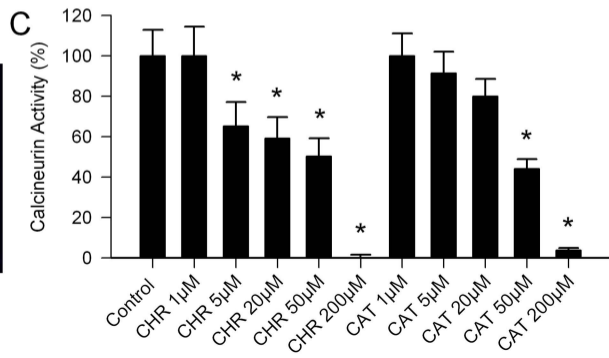
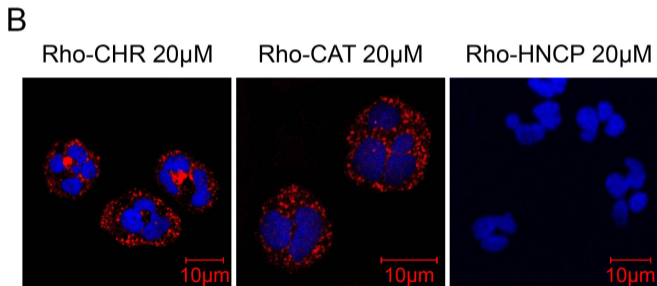
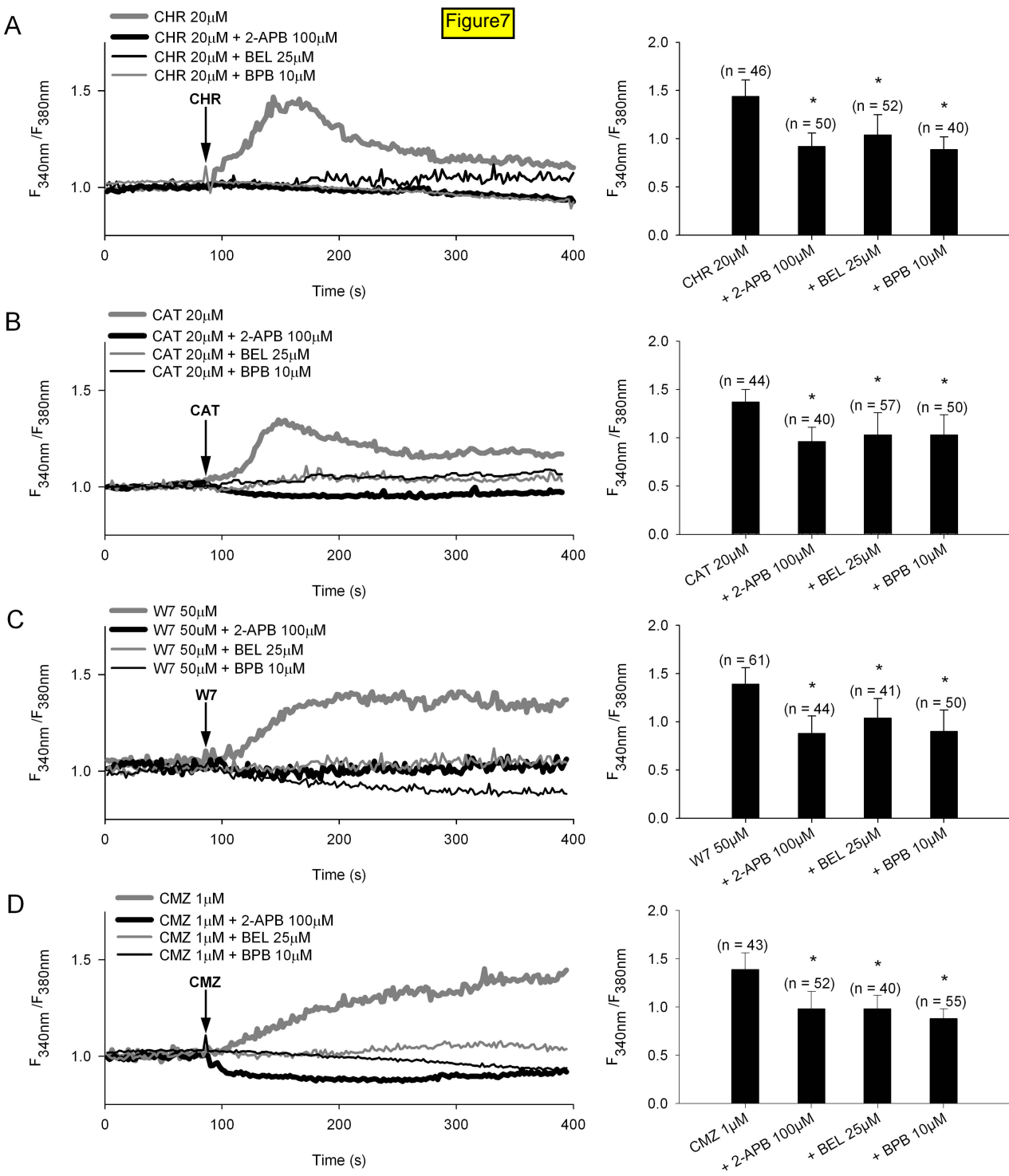
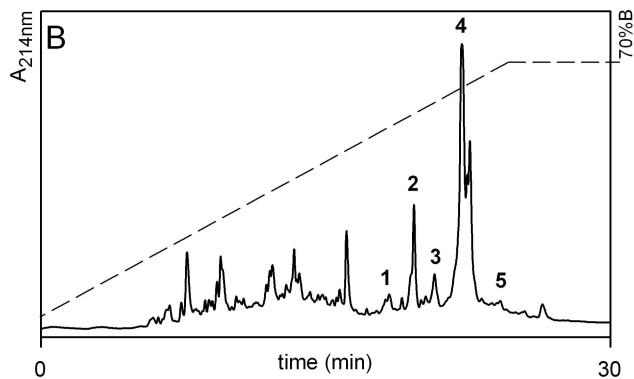
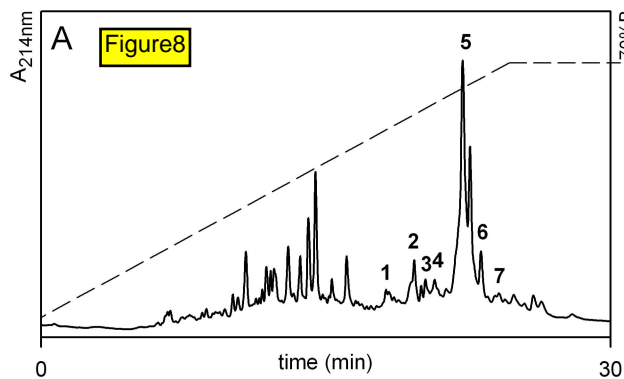


Figure5

Figure 7





C

Fraction	NCBI accession number	Protein
CHR1,2 / CAT1,2	gi-12083188	Lactoferrin precursor
CHR2 / CAT2	gi-847820	Lysozyme precursor
CHR3,4 / CAT3	gi-300181	Neutrophils gelatinase-associated lipocalin
CHR3,4 / CAT3	gi-4504965	Lymphocyte cytosolic protein 1
CHR5 / CAT4	gi-28977	Azurocidin
CHR5 / CAT4	gi-4506773	S100 calcium-binding protein A9
CHR6	gi-547199	Bactericidal permeability increasing protein
CHR7 / CAT5	gi-4505029	Leukotriene A4
CHR7	gi-4885431	Heat shock 70 kDa protein B

REVUE INVITEE
CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN

Innate immunity and natural peptides in mammals

**Marie-Hélène METZ-BOUTIGUE^{1*}, Peiman SHOOSHTARIZADEH¹, Gilles PREVOST²,
Jean-François CHICH^{1,3}**

¹ Inserm U575, Physiopathologie du Système Nerveux, 5 rue Blaise Pascal Strasbourg, France

² EA 3950, Institut de Parasitologie et de Pathologie Tropicale, Université Louis Pasteur-
Hôpitaux Universitaires de Strasbourg, 3 Rue Koeberlé Strasbourg, France

³ Institut National de la Recherche Agronomique, Virologie et Immunologie Moléculaires,
Jouy-en-Josas, France.

*, Corresponding author : Marie-Hélène Metz-Boutigue

E-mail : metz@neurochem.u-strasbg.fr

Tel: (+33) 3 88 45 66 09; Fax: (+33) 3 88 60 08 06

1- Introduction

1.1 History

Prior to the adaptative immune system development, the innate immune system has evolved during 2 millions years, constituting the primary defense in most of living organisms. Antimicrobial peptides are fundamental components of the innate immune defense of multicellular organisms, either animal or vegetal. They have been well conserved throughout the evolution and they ensure the organism's defence against a large number of pathogens.

In 1980, non-hemolytic antibacterial peptides cecropins, were discovered in hemolymph from the pupa of an hymenopter: *Cecropia hyalophora* (Hultmark et al, 1980). Three years later, the first two defensins (this name will be given later) were isolated from rabbit lung macrophages (Lehrer et al,1983). The discovery of magainins in the skin of the amphibian *Xenopus laevis*, induced the awareness of the scientific community that antibiotics from animals could be a new source of antibiotics that could be used in therapeutics (Zasloff, 1987).

The quest for antimicrobial peptides in a large number of animal species induced the discovery of bactenecins in bovine neutrophils, of defensins in numerous species, and many other peptides (Lehrer, 2004; Romeo et al, 1988). Most of them are small molecules (less than 40 amino-acids), but some can be of high molecular weight, like serprocidins, a family of AMPs found in azurophil granules from human neutrophils; this family being composed of elastase, cathepsin G, proteinase 3 and azurocidin (Almeida et al., 1996; Gabay and Almeida, 1993).

Taking in consideration the diversity of the living beings, it can be reasonably presumed that a large number of specific antibiotic peptides were developed during evolution, allowing a protection of each organism in various conditions and environments.

1.2 Classification

In 2008, more than 880 PAMs have been already identified, including peptides found in several tissues and cell types from invertebrates, plants and animals. Among them are found cytokines and chemokines, several neuropeptides and fragments derived from proteins exhibiting antimicrobial activity (Brogden, 2005). These peptides can be classified into several classes according to their amino-acids composition and their structures (Table V).

The first class is represented by anionic peptides such as small peptides (722-824 Da) found in surfactant extracts, broncho alveolar wash fluid and epithelial cells from human, ovine and bovine respiratory systems (Fales-Williams et al, 2002; Brogden, 2005). These peptides are produced at a micromolar concentration and zinc is a necessary cofactor for their antimicrobial activity.

The second class comprises approximately 290 strongly cationic peptides, structured as α -helices (<40 amino-acids), cystein free and some possess an “hinge” in their central part (Yount et al., 2006). The prototype of these peptides is LL-37, a peptide derived from human cathelicidin. Cathelicidins possess a 100 residues cathelin domain (a cathepsin L inhibitor) in their N-ter part, well conserved during evolution. Their C-ter part is composed by a variable domain, highly cationic and structured as an α -helice and exhibiting antimicrobial activity (fig. 9) (Dürr et al, 2006).

The third class contains only 44 cationic peptides, rich in particular amino-acids, such as proline (33-49 %) and arginine (13-33%) for bactenecins and PR-39 or tryptophane (39%) for indolicidine (Nidome et al, 1988; Khandelia et Kaznessis, 2007). These peptides are linear and can form extended coils (Brogden, 2005).

The fourth class comprises around 380 cationic and anionic peptides containing cysteine residues and several anti-parallel β -sheets stabilized by 2 or more disulfide bridges. Main peptides of this class are protegrin from swine leukocytes and the defensins family (Klotman and Chang, 2006; Ostberg and Kaznessis, 2005).

The fifth and last class is represented by anionic and cationic peptides that are fragments of large proteins: peptides from lactoferrin (lactoferricin and kaliocin), peptides derived from complement (C3, C3a and C3a-desArg), kinocidins (antimicrobial chemokines, CXCL1-4) and AMPs derived from neuropeptides or NPAMs (neuropeptide Y, substance P and chromogranins) (Young et al., 2006; Radek and Gall, 2007; Metz-Boutigue et al., 2003; Brogden, 2005).

1.3 Antimicrobial peptides synthesis

Expression of genes encoding AMPs is different according to organisms, tissues and cellular types. This expression can be local, systemic, or induced by several factors such as bacterial compounds, cellular damages and/or inflammatory stimuli (Mookherjee and Hancock, 2007). For example, hBD-1 defensin is constitutively expressed in epithelial cells from intestine, while hBD-2 expression is induced by IL-1b *via* NF- κ B in monocytes and by LPS or peptidoglycan in epithelial cells from intestine (Wang et al., 2003; Vora et al., 2004; Liu et al., 2003; Hertz et al., 2003). Moreover hBD-2, -3 expression induced by IL-22 in keratinocytes depends on the transcription factor STAT3 (Wolk et al., 2004). These data show that regulation of the expression of AMPs at the transcriptional level depends on the cellular type and on the stimuli.

In most of cases, AMPs are expressed locally: phagocytotic cells, epithelium (skin, respiratory, gut, urinary, genital), secretions in animals, seeds, roots and leaves in vegetal. Insects are an exception since they are able to produce AMPs in an inducible systemic response (Hoffmann et al., 1999).

AMPs are generally expressed as precursors that are proteolytically matured to give the biologically active peptides (Mookherjee and Hancock, 2007). For example, hCAP-18 (human cathelicidin antimicrobial protein) a major protein found in secondary granules of neutrophils, is stored as a precursor. The antimicrobial C-ter peptide LL-37 (fig)(Dürr et al, 2006) is obtained after proteolysis of the precursor by protease-3.

2. The main natural antimicrobial peptides

Cathelicidin,

Defensins,

Lactoferrin

Lysozyme

Hemoglobin

Ubiquitin

3. Neuropeptides and innate immunity

The HPA axis and the neuroimmune connection

Role of the microglia

VIP,

NPY

Substance P

Leptin

Chromogranins family

4. New antimicrobial molecules

Pentraxins

Alarmins

Microcins

Carterpillar

Mortalin

Lipopeptides, glycopeptides

RNase A super family

5. Antimicrobial peptides and barriers defenses

5.1 Antimicrobial peptides and skin

Mammal skin is the first defense barrier against external aggressions such as microbial pathogens, oxidant stress, chemical aggressions, mechanical insults, burns etc. For a long time, skin was considered as a simple physical barrier but it is in a process of continual regeneration and has its own immunological, histological and nervous responses to environment.

Skin is composed of three layers, from inside to outside: i) hypodermis or fat layer. ii) dermis, or *corium*, with a 3 to 5 mm thickness. iii) epidermis, with a thickness varying from 0.06 to 0.8 mm. This last layer can be subdivided himself into four layers. The deeper layer is composed of keratinocytes, melanocytes, Langerhans cells and Merkel cells. The three other layers are respectively *stratum spinosum*, *stratum granulosum* and *stratum corneum*. These layers are composed of more and more differentiated keratinocytes, synthesizing keratine in *stratum granulosum*, and losing nuclei and organelles.

Skin, and more specifically *stratum corneum*, acts as a barrier in several ways [1]. Corneocytes and extracellular matrix represent a physical barrier (“brick wall” model). The slightly acidic surface pH (env. 5.0) as well as the low hydration level of the skin represent a hostile milieu for pathogens, such as *S. aureus*. On the contrary, this milieu is ideal for the growth of the normal cutaneous microflora (*corynebacteriae* and *micrococcae*) that colonize skin, competes with pathogens for nutrients and synthesize antimicrobial compounds. Lipids (ceramides, cholesterol, free fatty acids) and their metabolic products present in *stratum corneum* act also as antimicrobial defense. Last, constitutive (and/or inducible) expression of antimicrobial peptides and proteins helps to maintain skin integrity and to prevent pathogen colonization. These evolutionary conserved components of the innate immune system can act as direct antimicrobial agents but have also a role as immunomodulatory molecules in normal skin as well as in skin diseases such as atopic dermatitis or psoriasis.

Lysozyme

Lysozyme is the first antimicrobial protein found in human skin. It was located in cytoplasm of epidermal cells in granular layers and in malpighian cells [2, 3]. Lysozyme is mainly active against Gram-positive bacteria (*S. aureus*) but is active on Gram-negative bacteria, acting probably as a control of bacterial growth. Up until recently, the contribution of lysozyme to cutaneous defense was subject to debate since it was not detected in *stratum corneum* as well as in washing fluid. However, it was recently detected in skin wash of adults and lysozyme concentration was 5 times higher in newborn skin than in adult [4], confirming its status of antimicrobial molecule as well as giving it an important role in preventing infections in newborn children.

Lactoferrin

This molecule was also detected in skin wash of adult and newborn children [4]. It is synthesized by melanocytes. Cutaneous lactoferrin is an iron-binding protein that has anti-bacterial properties. These properties are due to the ability of the protein to sequester iron in biological fluids or to destabilize bacterial membranes, limiting their proliferation and adhesion. It has also immunomodulatory properties by up and down regulating immune cells involved in inflammatory processes [5]. The protective anti-inflammatory role of lactoferrin is due to its ability to bind free ferric ion, and act as an anti-oxidant [4] but also LPS and their receptors during an infection [5]. For example, expression of virulence factors of *S. aureus* is modulated by transferrin and lactoferrin [6], demonstrating that ferrins play an important role in the host-pathogen interaction in skin and in mucosal tissue probably by LPS or its receptors binding.

Dermcidin derived peptides

Dermcidin DCD-1L is the main antimicrobial peptide in sweat that is produced constitutively by eccrine gland cells [7] and is transported to the epidermal surface [7]. It is a 47 amino acids protein produced from hydrolysis of a 9.3 kDa precursor by cathepsin D [8]. It has antibacterial properties at low concentration against *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* and *C. albicans*. It was shown that dermcidin induces the production by *S. aureus* of SepA, a proteolytic virulence factor, that cleaves and inactivates dermcidin [9].

DCD-1L is the most abundant antimicrobial peptide present in sweat, but other peptides derived from dermcidin by proteolysis were also found [8, 10]. The distribution of these peptides was found to be different according to the individuals. Most of them have 2 to 4 of the major DCD-derived peptides with the constant presence of at least one of the following peptides: DCD-1L (63-110), LEK-45 (66-110) and SSL-29 (63-91). The authors also showed that the distribution of these peptides is dependent on the body sites, correlates with the presence of eccrine sweat glands and not with apocrine glands, and that body parts in contact with pathogens (arms, face etc.) produce high levels of DCD-derived peptides. The anti-microbial activity of dermcidin-derived peptides was investigated [11] and showed that peptides like DCD-1L or SSL-23 do not disrupt bacterial membranes and kill bacteria by still unknown mechanisms.

Other roles for dermcidin were also reported, in cancer [12] or on body fat mobilization [13]. While dermcidin is considered as constitutively expressed, even in inflammatory conditions, it was shown that the expression level of its corresponding mRNA is greatly decreased in burned tissue [14], an observation requiring further investigation.

Recently, dermcidin precursor was found in human cervico-vaginal fluid [15]: a proteomic approach revealed the presence of proteins already described in this fluid, namely haptoglobin, neutrophil defensin, lysozyme and lactoferrin, but also, among other molecules, of dermcidin precursor. Dermcidin precursor was also found in human gestational tissue [16] where it is supposed to play a role in pregnancy by regulating trophoblastic functions. These authors describe also a proteolytic function for dermcidin, inducing invasive phenotype for a cell line. Thus, dermcidin could intervene in normal (development) as well as in pathologic proliferation (cancer) processes.

Cathelicidin, LL-37, hCAP18

Cathelicidin is found in eccrine gland cells but also in the circulation. The CAP18 precursor is produced in skin by keratinocytes and is processed within neutrophils, keratinocytes and mast cells by inflammation or injury. The resulting peptides, KS-30 and RK-21, exhibit antimicrobial properties against pathogenic bacteria. In circulation, the mature form is LL-37, after processing of CAP18 by neutrophil-derived elastase and proteinase-3. Other proteases can produce other peptides than LL-37.

Cathelicidin expression is also regulated at the transcriptional level. Bacterial LPS, cutaneous injury as well as pro-inflammatory mediators (IL-6, retinoic acid) induce expression of cathelicidin. Cell differentiation can also regulate its activity.

The LL-37 is intensively studied and besides its large antibacterial spectrum, it is considered as a mediator between innate and adaptative immunity [17].

RNase A superfamily, RNase 7

Eight known functional genes encoding RNase A ribonucleases are encoding small polypeptides of 15 kDa [18]. Besides their well documented ribonuclease activity, some of these proteins have anti-pathogens activities not related to their primary function. Eosinophil-derived neurotoxin (EDN/RNase 2) and eosinophil cationic peptide (ECP/RNase 3) are proteins secreted by eosinophilic leukocytes and were primarily tested for their toxic role against parasites. *In vitro*, ECP has also an activity against gram-positive and gram-negative bacteria [19].

Harder and Schröder [20] identified RNase A7 as a major agent of the innate immune response of the skin. This protein was active on gram-positive and gram-negative bacteria and also on *C. albicans*. RNase 7 transcripts were induced in keratinocyte culture by addition of TNF-alpha, interferon-gamma, interleukin-1beta and in the presence of bacteria [20].

Psoriasin (S100A7)

Psoriasin belongs to the S100 family of calcium-binding proteins. This family is composed of 21 genes and 11 proteins have been found to be expressed in human epidermis or in cultured keratinocytes. Langerhans cells and melanocytes [21, 22] express S100B and Meissner's corpuscles (sensorial receptors localized in the upper part of dermis) express S100P [23]. These proteins possess two EF hands (helix-loop-helix calcium binding domains) and they act probably as calcium sensors. Several functions have been proposed for S100 proteins in keratinocytes, the main role being an implication in skin inflammatory processes [24]. Another role could be keratinocytes membrane remodeling that occurs during differentiation: psoriasin and another member of the S100 family, calgranulin-a (S100A9), have been shown to have their expression correlated with the degree of keratinocyte differentiation, suggesting that they are involved in this process [25]. A third role could be an involvement in the formation of calcium channels, in conjunctions with annexins. Other postulated roles concern S100 proteins as substrate for

transglutaminase, resulting in an incorporation of S100 in the cornified envelope; a last role could be a response to exogenous agents that modulate S100 proteins distribution and consequently their function [26].

Psoriasin has been found to be overexpressed in psoriasis. It is produced in *stratum corneum* by keratinocytes [27] and its basal expression is influenced by extracellular calcium level. Its expression in normal adult tissue is low but high expression levels were detected in fetal skin, like transferrin (see above), suggesting a protective role in innate immunity. Psoriasin was found to be the main *E. coli*-cidal agent in the skin. It has been shown to chemoattract neutrophils and CD4⁺ T cells [24]. Moreover, psoriasin mediates the production of several inflammatory cytokines and chemokines from neutrophils via MAPK p38 and ERK activation. It also induces reactive oxygen species production and the exocytosis of alpha-defensins from neutrophils [28].

Beta-defensins, alpha-defensins

Actually, 4 β -defensins were identified in neutrophils (hBD-1 to -4) and 2 more (hBD-5 and hBD-6) were found to be expressed by Paneth cells of the small intestine. The first inducible human defensin, hBD-2, was identified in psoriatic lesions as the most abundant AMP. It was found to be expressed in terminally differentiated keratinocytes, in a structure located in *stratum corneum*, lamellar bodies that contains lipid-rich secretory granules. It is probably released with lipid-like content of these lamellar bodies [29]. hBD-2 is also up-regulated locally by infections [30] or wounds [31]. It has preferential bactericidal properties against gram-negative bacteria [32] and like LL-37, its effect is sensitive to the concentration of NaCl [33]. hBD-2 derived from neutrophils promotes prostaglandins production and histamine release from mast cells, playing a role in allergic response [34]. hBD-2 has also chemotactic properties for immature dendritic cells and memory T cells; it was described to bind to CCR-6, the receptor for macrophage inflammatory protein 3 α [35] but this observation was not confirmed [36]. hBD-2 expression is stimulated by several cytokines [37, 38] but IL-1 seems to be the major inducer of hBD-2 production by these cells, as showed by *in vitro* experiments where LPS alone or LPS-treated monocytes induced its production [39]. Bacteria can also stimulate the expression of hBD-2 by epithelial cells, in a cytokine-independent pathway. *P. aeruginosa* is a powerful inducer of hBD-2 by primary keratinocytes [27].

hBD-1 was considered as a constitutively expressed antimicrobial peptide and in particular not induced by proinflammatory cytokines. However, its production can be induced by peptidoglycan or LPS exposure [40]. It is expressed in malpighian layer and in *stratum corneum* [41] and this expression is induced by increasing concentration of calcium [42], condition that provokes keratinocyte differentiation *in vitro* [43].

hBD-3 has its expression induced by EGF that induces keratinocytes proliferation in skin wounds [44]. It has chemotactic properties on monocytes [45]. While its expression is not induced by infection, hBD-3 has a broad spectrum antimicrobial activities against gram-positive and gram-negative bacteria, as well as against fungi [46].

hBD-2, 3 and 4 stimulates expression of proinflammatory cytokines, IP-10, IL-10 and MCP-1 [47]. They also stimulate the phosphorylation of STAT-1 and STAT-3 that induce keratinocytes migration and proliferation.

Alpha-defensin were identified in gastrointestinal, urogenital tract and in circulating immune cells [30]. They do not appear to be particularly involved in skin defense.

Neuropeptides in skin immunity

This term regroups neuropeptides with antimicrobial activities, linking together nervous and immune system [30]. Both systems can influence each other; brain and peripheral nervous system directly influence the activity of innate and adaptative immune system. Immune system can relay signals to the nervous system via the production of growth factors and cytokines. For example, stress can induce alterations in the immune response [48], or can be elicited by infection or injury with release of neuropeptides [49].

Exchange between both systems can occur at systemic as well as at regional or local levels [50]. The first, global level regroups sympathetic nervous system, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and circulating neuro-antimicrobial peptides. The second, local level, is composed of nervous endings, neuropeptide-releasing cells and receptors-exhibiting cells.

At the skin level, important actors are neuropeptide-producing cells, cutaneous nervous cells and target cells. Merkel cells [51] are localized at the basement membrane separating epidermis from dermis. They possess dense-core granules that contains CGRP and VIP, they also display an immunoreactivity for CgA and derived peptides [52, 53] and pancreastatin [54]. They are connected to nervous system with terminal sensory synapses. Merkel cells have characteristics of

both epidermal and neuroendocrine cells. Some doubt remains on their embryologic origin (epidermis or neural crest), but it seems likely that they are modified keratinocytes, acquiring neuroendocrine characteristics postnatally [51]. Keratinocytes and fibroblasts are major targets for these peptides; they express functional neurokinin receptors with high affinity for substance P (neurokinin-1) [55] and for VIP and PACAP [56].

As a general rule, neuro-antimicrobial peptides (CGRP, adrenomedullin, substance P) stimulate skin cell proliferation and promote fibroblast migration. VIP and CGRP alone, or in conjunction with SP stimulate keratinocytes proliferation, while the role of VIP and CGRP on skin fibroblast is less defined. SP and neuropeptide Y stimulate endothelial cell proliferation. Taken together, these observations show that neuro-antimicrobial peptides are important players in wound healing. They can also play an important role in hyperproliferative skin disorders or mesenchymal dysfunction like scleroderma. All these peptides play also a role in neurogenic inflammation, this role being particularly marked for substance P and CGRP. CGRP and adrenomedullin induce arteriole vasodilatation, VIP and neuropeptide Y induce mast cell degranulation and histamine release [57].

α -melanocyte-stimulating hormone (α -MSH), a 13 amino-acids peptide, is synthesized by keratinocytes, melanocytes, monocytes and astrocytes [58]. This peptide derives from the pro-opiomelanocortin (POMC) after a cascade of proteolysis [59] that results also in the production of five other peptides. These peptides bind to melanocortin receptor in brain and in peripheral tissues, coupled to G-protein receptors involved in melanocyte pigmentation and in suppression of inflammatory response [30]. Indeed, α -MSH has anti-inflammatory properties *in vivo* [60] and *in vitro* [61]. It inhibits the activation of the transcription factor NF- κ B and consequently, several genes under NF- κ B control, especially several proinflammatory cytokines [62]. It has been shown to stimulate the production of the anti-inflammatory IL-10. Concomitantly, it reduces the upregulation of ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) [63] that is required for T cells activation [60]. Beside these roles, α -MSH acts as an AMP by inhibiting *S. aureus* and *C. albicans* growth at picomolar concentration [64]. Interestingly, the tripeptide KPV (α -MSH 11-13) exhibited similar anti microbial properties [60, 65, 66], without effect on melanocytes [67]. Thus, α -MSH acts in two ways; it has a direct antimicrobial effect at very low concentration and reduces inflammatory responses associated with UV induced epithelial injury [30].

The granin family of proteins (chromogranin/secretogranin) is ubiquitously distributed in secretory granules of endocrine, neuroendocrine and neuronal cells. The chromogranin A was originally isolated from chromaffin cells of adrenal medulla. These proteins are proteolytically processed into small peptides having antimicrobial as well as immunomodulatory properties [68]. Catestatin (CgA 344-364) induces mast cells degranulation and histamine release [69]. Moreover, it has been shown that mice deficient in CgA are more susceptible to an infection by *Streptococcus* than normal mice [30]. These results and the ubiquitous presence of granins strengthens the link between immune and nervous system.

Skin diseases: atopic dermatitis, psoriasis in relation with antimicrobial peptides

Atopic dermatitis and psoriasis are two chronic inflammatory diseases that were considered up to recently due to deficient immune conditions involving T-cells and the cytokines they produce as well as AMPs [70, 71]. Lesional skin of patients is infiltrated with activated T cells that produce inflammatory cytokines, but the proliferation of keratinocytes could be a cause or a consequence of the immunocyte influx. Atopic dermatitis is dominated by Th2 cytokines (IL-4, IL-5 and IL-13) while psoriasis is dominated by Th1 cytokines (IFN-gamma, TNF-alpha). Atopic dermatitis is characterized by recurrent bacterial or viral infections, by a modification of the lipid composition of the skin, by an increase of proteolytic activity and a decrease of the amount of AMPs, especially dermcidin, hCAP18/LL-37 and defensins. Psoriasis is characterized by hyperproliferation and differentiation of keratinocytes, vascular alterations and epidermal infiltration. In psoriasis, the amount of AMPs (psoriasin, defensins, LL-37, RNase 7, lysozyme) is increased, as well as the amount of immunocytes, resulting in a protection of the patient against infections [72].

The exact etiology of each disease is not fully understood but a combination of genetic, immunologic and environmental factors is probably involved [73]. Recent results emphasize the influence of genetic differences [70] to explain the over-expression of AMPs in psoriatic patients, leading to a innate protection against pathogens at the price of an inflammatory disease. These authors conclude that in atopic dermatitis, immunocyte influx in skin is a consequence of a deregulation in keratinocyte proliferation.

5.2 Antimicrobial peptides and gut

Gastrointestinal mucosa is a large host-environmental interface that has several functions. The main function is the digestive process himself including absorptive processes and nutrients peristaltism. Others functions consist on a physical and immunological protection of the body against microbes and a reconnaissance between commensal and pathogenic micro-organisms. To accomplish these functions, the gastrointestinal mucosa has a remarkable organization. *Lamina propria* is a conjunctive tissue composed of fibroblasts, immune cells and collagen. It also contains capillaries and lymphatic vessels. Epithelial cells, or enterocytes, are tightly disposed on a single layer separating the lumen from the *lamina propria*. These cells are tightly joined by tight junctions forming an impermeable barrier to commensal flora and to pathogens. Brush-border microvilli are present on the apical surface of absorptive enterocytes, representing a large absorbing surface and allowing attachment of micro organisms to the gut. Other cellular types are present in the gastrointestinal tracts. Microfold cells do not possess microvilli. They express a proteolytic enzyme, cathepsin E, Toll-like receptors and are able to produce proinflammatory cytokines and chemokines. The main function of these cells is the transport of antigens from the lumen to the subepithelial lymphoid tissue.

Several anatomical structures are present along the gastrointestinal tractus. Peyer's patches are lymphoid structures containing B and T cells, macrophages and dendritic cells. Lieberkühn crypts are found in the small intestine and they constitute the basis of the intestinal villi. They contain multipotent stem cells and Paneth cells, involved in gastrointestinal immunity. Two other cellular types are present in intestine : i) goblet cells synthesize and secrete large quantities of mucin. ii) enterochromaffin cells that originate from neural crest and synthesizing serotonin (5-HT) and numerous neuropeptides.

Lysozyme, Phospholipase A2

Lysozyme is synthesized and secreted by Paneth cells, macrophages, neutrophils and epithelial cells [74, 75]. Its role and selectivity towards microbes is the same as in skin. Phospholipase A2 is synthesized by Paneth cells [76]. This enzyme hydrolyses bacterial membrane phospholipids.

Cathelicidin

Cathelicidin LL-37/hCAP18 is synthesized by neutrophils where it was first identified [77] and epithelial cells of the colon [78]. It has the same broad specificity against microbes in gut than in skin. Cathelicidin was shown to have multiple effects by multipole mechanisms on immune cells. *In vitro*, it has chemotactic properties for immune cells: monocytes, macrophages, T cells [79]. LL-37 is found in sites of inflammation where it modify DC differentiation, linking innate and adaptative immunity. *In vitro*, modified DCs had, among others characteristics induced by the peptide, enhanced secretion of Th-1 inducing cytokines and promoted Th1 responses [80]. LL-37 acts synergetically with IL-1- β to increase the production by macrophages of cytokines (IL-6 and IL-10) and chemokines MCP-1 and MCP-3, reinforcing several kinds of immune responses [81]. It acts via the activation of phosphorylation of the kinase Akt and the transcription factor CREB. In LPS-stimulated monocytes, LL-37 inhibits the release of TNF- α . It modulates inflammatory response induced by LPS, endotoxins and other agonists of TLRs [82].

RNases and C-type lectins

Angiogenin-4 (Ang-4) is a member of the ribonucleases family. This protein is synthesized by Paneth cells and is similar to RNase 7 found in skin. Its secretion is stimulated by exposure to LPS. Ang-4 kills *E. faecalis* or *L. monocytogenes* at low concentration (around 1 μ M) but its concentration in crypts can be 1000 times greater [83]. Similarly to defensins, it is sensitive to salt concentration and can be cytotoxic to eukaryotic cells [84].

C-type lectins HIP/PAP are synthesized in human by enterocytes and Paneth cells. The same protein exist in mouse and is named RegIII γ . These lectins bind Gram+ peptidoglycan and act by direct killing. Several members of this family are found in gastrointestinal tissues [85].

Defensins

As in skin, defensins have direct anti-microbial role as well as immunomodulatory function. Alpha-defensins in the gastrointestinal tractus are synthesized by Paneth cells [86]. Since they are synthesized in germ-free conditions [87] and/or prenatally [88], α -defensin expression does not require microbe induction. In transfected mouse, it was shown that the α -defensin HBD-5 protects efficiently from infection by *Salmonella typhimurium*, demonstrating the direct antimicrobial effect of this peptide. In mouse, α -defensin are named cryptins and diversses families of peptides related to cryptdins are regrouped under the term CRS (Cryptdin Related

Sequences). Interestingly, these CRS can form homo or heterodimers, allowing thus a combinatorial diversity for struggle against pathogens [89].

β -defensins are expressed in enterocytes of the small and large intestine. 28 β -defensins genes have been identified in human genome but only 8 were found to be expressed. HBD-1 is expressed constitutively in absence of stimuli or bacterial infection [90] while some nutrients can stimulate its production in cell lines [91]. In mouse, an infection by the parasite *Cryptosporidium* resulted in a down-regulation of mBD-1 [92], but *in vitro*, sporozoites were killed by this defensin. Some authors conclude on a unique and important regulation of HBD-1 during small intestinal infections [93]. HBD-2 is not constitutively expressed but is induced by an infection or by proinflammatory stimuli [90]. HBD-3 and -4 are inducible and particularly expressed in crypt regions [94]. However, variation of mRNA levels is not always correlated to the expression of the corresponding protein(s).

Defensins can also act as chemo-attractant for immune cells in a manner similar to that described for the skin.

Neuropeptides

Enterochromaffin (or Kulchitsky [95]) cells are enteroendocrine cells that are present in the intestine, especially colon [96] and contain large amounts of serotonin (5-HT). These cells can sense luminal content and release their content basolaterally and activate afferent neuron endings within lamina propria, allowing information exchange between gut and central nervous system [97]. Besides this important role, EC secrete also numerous others products, among them VIP [98], Substance P [99], chromogranin A and B [100], secretogranin 2 [98], melatonin [101] etc.

Despite the great interest of these cells, their sparse repartition and their low number did not allowed to study them carefully. Recently, a model was proposed, BON cells [102] that will enhance further research. While the presence of proteins related to odor binding was already described [98], this model allowed the discovery of the expression of 4 Odor Binding Protein Receptors. When EC were stimulated by odors, they released serotonin, showing that these cells can also be stimulated by spices, fragrances etc. [103]. Moreover, a new method was proposed allowing to isolate and purify EC from biopsies [104].

Inflammatory bowel syndromes

IBD regroups several inflammatory diseases like ulcerative colitis or Crohn disease. The precise etiology of these diseases is stills matter of debate. According to some authors, CD is a genetically determined disease [105]. Specific mutations of NOD2 have been associated with increasing susceptibility to CD in western but not asian populations. These mutations affect particularly (90 %) the Leucine Rich Region (LRR) of the protein that recognizes bacterial muramyl dipeptides. Several consequences arise from this defect: NF- κ B signalization is affected in enterocytes as well as in leucocytes and the balance in the secretion of interleukine is modified [106]. In parallel, secretion of anti microbial peptides is also modified: in UC, colonic expression of α - and β -defensins is increased while in CD, the regulation is complex and depends on the clinical phenotype and genotype of the patient [107]. Colonic expression of HD-5 and HD-6 is enhanced in CD but their expression in ileal epithelial cells is unchanged or reduced [108, 109]. These observations correlate with a decrease of the number of Paneth cells in the small intestine and an increase in the colon, in CD patients [110]. The decrease is more pronounced in patients with NOD2 mutations [111]. Interestingly, secretory granules and NOD2 protein were found to be located in close proximity, leading to speculate that NOD2 could be directly involved in the secretion of AMPs during an infection [112]. A strong argument for the implication of NOD2 in gut immunity was supported by transfection of CaCo2 cells by NOD2 [113]. When tranfected with the normal gene, cells were resistant to infection; when the gene was deficient, bacterial growth was not inhibited.

Taken together, these data suggests a strong implication of NOD2 mutations in CD that can affect intracellular signalization, stimulate gut inflammation, release of antimicrobial peptides and as a consequences, the modification of immunity against pathogens as well as modified immunomodulatory properties mediated by AMPs. However, the role of NOD2 in CD is still discussed: NOD2 mutations could be predisposing factors rather than initiating factors for the disease [114].

TLRs, in particular TLR4, were also proposed to play a role in CD [114]. Mutations affecting Tlr4 gene decrease NF- κ B activation, impair the response to pathogens and predispose to chronic inflammation.

Recent results suggest an implication of a neuropeptide, substance P, in the pathophysiology of IBD, especially in CD. Mesenteric obesity was shown to be directly associated with the development of CD [115]. Preadipocytes present in fat mass may contribute to intestinal

inflammation by the production of proinflammatory cytokines in response to substance P and by secreting pro-inflammatory TNF- α , chemoattractant for macrophages. Chemokines are secreted in large amounts and enter probably in the circulation, generalizing thus the inflammatory response. While the origin of substance P is not precised by authors, it could be hypothesized that it is secreted from enterochromaffin cells, linking gut and nervous system [116, 117].

Others

1.4 Biological roles of antimicrobial peptides with immune cells

PMNs

Lymphocytes

Macrophages

Dendritic cells

3. Roles of pathogenic virulence factors for the antimicrobial peptides expression

8- Involvement of antimicrobial peptides in physiopathology

Stress

Inflammation

Infectious diseases

Diabetes

Inflammatory intestine diseases

Cardiovascular diseases

Neurodegenerative diseases

10-Antimicrobial peptides and drugs

11- Conclusions

Bibliography (To complete)

- [1] Elias, P. M. *Semin Immunopathol*, **2007**, *29*, 3-14.
- [2] Ogawa, H.; Miyazaki, H.; Kimura, M. *J Invest Dermatol*, **1971**, *57*, 111-6.
- [3] Papini, M.; Simonetti, S.; Franceschini, S.; Scaringi, L.; Binazzi, M. *Arch Dermatol Res*, **1982**, *272*, 167-70.
- [4] Walker, V. P.; Akinbi, H. T.; Meinzen-Derr, J.; Narendran, V.; Visscher, M.; Hoath, S. B. *J Pediatr*, **2008**, *152*, 777-81.
- [5] Legrand, D.; Ellass, E.; Carpentier, M.; Mazurier, J. *Cell Mol Life Sci*, **2005**, *62*, 2549-59.
- [6] Kansal, R. G.; Aziz, R. K.; Kotb, M. *J Infect Dis*, **2005**, *191*, 2121-9.
- [7] Schitteck, B.; Hipfel, R.; Sauer, B.; Bauer, J.; Kalbacher, H.; Stevanovic, S.; Schirle, M.; Schroeder, K.; Blin, N.; Meier, F.; Rassner, G.; Garbe, C. *Nat Immunol*, **2001**, *2*, 1133-7.
- [8] Baechle, D.; Flad, T.; Cansier, A.; Steffen, H.; Schitteck, B.; Tolson, J.; Herrmann, T.; Dihazi, H.; Beck, A.; Mueller, G. A.; Mueller, M.; Stevanovic, S.; Garbe, C.; Mueller, C. A.; Kalbacher, H. *J Biol Chem*, **2006**, *281*, 5406-15.
- [9] Lai, Y.; Villaruz, A. E.; Li, M.; Cha, D. J.; Sturdevant, D. E.; Otto, M. *Mol Microbiol*, **2007**, *63*, 497-506.
- [10] Rieg, S.; Seeber, S.; Steffen, H.; Humeny, A.; Kalbacher, H.; Stevanovic, S.; Kimura, A.; Garbe, C.; Schitteck, B. *J Invest Dermatol*, **2006**, *126*, 354-65.
- [11] Steffen, H.; Rieg, S.; Wiedemann, I.; Kalbacher, H.; Deeg, M.; Sahl, H. G.; Peschel, A.; Gotz, F.; Garbe, C.; Schitteck, B. *Antimicrob Agents Chemother*, **2006**, *50*, 2608-20.
- [12] Stewart, G. D.; Skipworth, R. J.; Ross, J. A.; Fearon, K.; Baracos, V. E. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **2008**, *11*, 208-13.
- [13] Kim, K. A.; Ka, S. O.; Moon, W. S.; Yi, H. K.; Lee, Y. H.; Kwon, K. B.; Park, J. W.; Park, B. H. *J Endocrinol*, **2008**.
- [14] Kaus, A.; Jacobsen, F.; Sorkin, M.; Rittig, A.; Voss, B.; Daigeler, A.; Sudhoff, H.; Steinau, H. U.; Steintraesser, L. *Burns*, **2008**, *34*, 32-40.
- [15] Shaw, J. L.; Smith, C. R.; Diamandis, E. P. *J Proteome Res*, **2007**, *6*, 2859-65.
- [16] Lee Motoyama, J. P.; Kim-Motoyama, H.; Kim, P.; Nakagama, H.; Miyagawa, K.; Suzuki, K. *Biochem Biophys Res Commun*, **2007**, *357*, 828-33.
- [17] Kai-Larsen, Y.; Agerberth, B. *Front Biosci*, **2008**, *13*, 3760-7.
- [18] Dyer, K. D.; Rosenberg, H. F. *Mol Divers*, **2006**, *10*, 585-97.
- [19] Lehrer, R. I.; Szklarek, D.; Barton, A.; Ganz, T.; Hamann, K. J.; Gleich, G. J. *J Immunol*, **1989**, *142*, 4428-34.
- [20] Harder, J.; Schroder, J. M. *J Biol Chem*, **2002**, *277*, 46779-84.
- [21] Boni, R.; Burg, G.; Doguoglu, A.; Ilg, E. C.; Schafer, B. W.; Muller, B.; Heizmann, C. W. *Br J Dermatol*, **1997**, *137*, 39-43.
- [22] Broome, A. M.; Ryan, D.; Eckert, R. L. *J Histochem Cytochem*, **2003**, *51*, 675-85.
- [23] Del Valle, M. E.; Vazquez, E.; Represa, J.; Malinovsky, L.; Vega, J. A. *Neurosci Lett*, **1994**, *168*, 247-50.
- [24] Jinqun, T.; Vorum, H.; Larsen, C. G.; Madsen, P.; Rasmussen, H. H.; Gesser, B.; Etzerodt, M.; Honore, B.; Celis, J. E.; Thestrup-Pedersen, K. *J Invest Dermatol*, **1996**, *107*, 5-10.
- [25] Martinsson, H.; Yhr, M.; Enerback, C. *Exp Dermatol*, **2005**, *14*, 161-8.
- [26] Eckert, R. L.; Broome, A. M.; Ruse, M.; Robinson, N.; Ryan, D.; Lee, K. *J Invest Dermatol*, **2004**, *123*, 23-33.

- [27] Schroder, J. M.; Harder, J. *Cell Mol Life Sci*, **2006**, *63*, 469-86.
- [28] Zheng, Y.; Niyonsaba, F.; Ushio, H.; Ikeda, S.; Nagaoka, I.; Okumura, K.; Ogawa, H. *Immunology*, **2008**.
- [29] Oren, A.; Ganz, T.; Liu, L.; Meerloo, T. *Exp Mol Pathol*, **2003**, *74*, 180-2.
- [30] Radek, K.; Gallo, R. *Semin Immunopathol*, **2007**, *29*, 27-43.
- [31] Butmarc, J.; Yufit, T.; Carson, P.; Falanga, V. *Wound Repair Regen*, **2004**, *12*, 439-43.
- [32] Harder, J.; Bartels, J.; Christophers, E.; Schroder, J. M. *Nature*, **1997**, *387*, 861.
- [33] Bals, R.; Wang, X.; Wu, Z.; Freeman, T.; Bafna, V.; Zasloff, M.; Wilson, J. M. *J Clin Invest*, **1998**, *102*, 874-80.
- [34] Befus, A. D.; Mowat, C.; Gilchrist, M.; Hu, J.; Solomon, S.; Bateman, A. *J Immunol*, **1999**, *163*, 947-53.
- [35] Yang, D.; Chertov, O.; Bykovskaia, S. N.; Chen, Q.; Buffo, M. J.; Shogan, J.; Anderson, M.; Schroder, J. M.; Wang, J. M.; Howard, O. M.; Oppenheim, J. J. *Science*, **1999**, *286*, 525-8.
- [36] Soruri, A.; Grigat, J.; Forssmann, U.; Riggert, J.; Zwirner, J. *Eur J Immunol*, **2007**, *37*, 2474-86.
- [37] Ganz, T. *Nat Rev Immunol*, **2003**, *3*, 710-20.
- [38] Kanda, N.; Watanabe, S. *Eur J Immunol*, **2008**, *38*, 1287-96.
- [39] Kanda, N.; Watanabe, S. *Endocrinology*, **2008**.
- [40] Sorensen, O. E.; Thapa, D. R.; Rosenthal, A.; Liu, L.; Roberts, A. A.; Ganz, T. *J Immunol*, **2005**, *174*, 4870-9.
- [41] Ali, R. S.; Falconer, A.; Ikram, M.; Bissett, C. E.; Cerio, R.; Quinn, A. G. *J Invest Dermatol*, **2001**, *117*, 106-11.
- [42] Harder, J.; Meyer-Hoffert, U.; Wehkamp, K.; Schwichtenberg, L.; Schroder, J. M. *J Invest Dermatol*, **2004**, *123*, 522-9.
- [43] Lichti, U.; Anders, J.; Yuspa, S. H. *Nat Protoc*, **2008**, *3*, 799-810.
- [44] Sorensen, O. E.; Thapa, D. R.; Roupe, K. M.; Valore, E. V.; Sjobring, U.; Roberts, A. A.; Schmidtchen, A.; Ganz, T. *J Clin Invest*, **2006**, *116*, 1878-85.
- [45] Garcia, J. R.; Jaumann, F.; Schulz, S.; Krause, A.; Rodriguez-Jimenez, J.; Forssmann, U.; Adermann, K.; Kluver, E.; Vogelmeier, C.; Becker, D.; Hedrich, R.; Forssmann, W. G.; Bals, R. *Cell Tissue Res*, **2001**, *306*, 257-64.
- [46] Harder, J.; Bartels, J.; Christophers, E.; Schroder, J. M. *J Biol Chem*, **2001**, *276*, 5707-13.
- [47] Niyonsaba, F.; Ushio, H.; Nakano, N.; Ng, W.; Sayama, K.; Hashimoto, K.; Nagaoka, I.; Okumura, K.; Ogawa, H. *J Invest Dermatol*, **2007**, *127*, 594-604.
- [48] Webster, J. I.; Tonelli, L.; Sternberg, E. M. *Annu Rev Immunol*, **2002**, *20*, 125-63.
- [49] Brogden, K. A.; Guthmiller, J. M.; Salzet, M.; Zasloff, M. *Nat Immunol*, **2005**, *6*, 558-64.
- [50] Sternberg, E. M. *Nat Rev Immunol*, **2006**, *6*, 318-28.
- [51] Lucarz, A.; Brand, G. *Eur J Cell Biol*, **2007**, *86*, 243-51.
- [52] Hartschuh, W.; Weihe, E.; Egner, U. *J Invest Dermatol*, **1989**, *93*, 641-8.
- [53] Hartschuh, W.; Weihe, E.; Yanaihara, N. *Arch Histol Cytol*, **1989**, *52 Suppl*, 423-31.
- [54] Hartschuh, W.; Weihe, E. *Neurosci Lett*, **1989**, *98*, 258-63.
- [55] Scholzen, T.; Armstrong, C. A.; Bunnett, N. W.; Luger, T. A.; Olerud, J. E.; Ansel, J. C. *Exp Dermatol*, **1998**, *7*, 81-96.
- [56] Pozo, D. *Trends Mol Med*, **2003**, *9*, 211-7.
- [57] Arzubiaga, C.; Morrow, J.; Roberts, L. J., 2nd; Biaggioni, I. *J Allergy Clin Immunol*, **1991**, *87*, 88-93.

- [58] Wikberg, J. E.; Muceniece, R.; Mandrika, I.; Prusis, P.; Lindblom, J.; Post, C.; Skottner, A. *Pharmacol Res*, **2000**, *42*, 393-420.
- [59] Pritchard, L. E.; White, A. *Endocrinology*, **2007**, *148*, 4201-7.
- [60] Hiltz, M. E.; Lipton, J. M. *Peptides*, **1990**, *11*, 979-82.
- [61] Manna, S. K.; Aggarwal, B. B. *J Immunol*, **1998**, *161*, 2873-80.
- [62] Taherzadeh, S.; Sharma, S.; Chhajlani, V.; Gantz, I.; Rajora, N.; Demitri, M. T.; Kelly, L.; Zhao, H.; Ichiyama, T.; Catania, A.; Lipton, J. M. *Am J Physiol*, **1999**, *276*, R1289-94.
- [63] Bhardwaj, R. S.; Schwarz, A.; Becher, E.; Mahnke, K.; Aragane, Y.; Schwarz, T.; Luger, T. A. *J Immunol*, **1996**, *156*, 2517-21.
- [64] Cutuli, M.; Cristiani, S.; Lipton, J. M.; Catania, A. *J Leukoc Biol*, **2000**, *67*, 233-9.
- [65] Mandrika, I.; Muceniece, R.; Wikberg, J. E. *Biochem Pharmacol*, **2001**, *61*, 613-21.
- [66] Mugridge, K. G.; Perretti, M.; Ghiara, P.; Parente, L. *Eur J Pharmacol*, **1991**, *197*, 151-5.
- [67] Sawyer, T. K.; Staples, D. J.; Castrucci, A. M.; Hadley, M. E.; al-Obeidi, F. A.; Cody, W. L.; Hruby, V. J. *Peptides*, **1990**, *11*, 351-7.
- [68] Helle, K. B.; Corti, A.; Metz-Boutigue, M. H.; Tota, B. *Cell Mol Life Sci*, **2007**, *64*, 2863-86.
- [69] Kruger, P. G.; Mahata, S. K.; Helle, K. B. *Regul Pept*, **2003**, *114*, 29-35.
- [70] Zeeuwen, P. L.; de Jongh, G. J.; Rodijk-Olthuis, D.; Kamsteeg, M.; Verhoosel, R. M.; van Rossum, M. M.; Hiemstra, P. S.; Schalkwijk, J. *PLoS ONE*, **2008**, *3*, e2301.
- [71] Yamasaki, K.; Gallo, R. L. *Eur J Dermatol*, **2008**, *18*, 11-21.
- [72] Henseler, T.; Christophers, E. *J Am Acad Dermatol*, **1995**, *32*, 982-6.
- [73] Bonness, S.; Bieber, T. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, **2007**, *7*, 382-6.
- [74] Mason, D. Y.; Taylor, C. R. *J Clin Pathol*, **1975**, *28*, 124-32.
- [75] Satoh, Y.; Ishikawa, K.; Tanaka, H.; Oomori, Y.; Ono, K. *Acta Histochem*, **1988**, *83*, 185-8.
- [76] Nevalainen, T. J.; Gronroos, J. M.; Kallajoki, M. *Lab Invest*, **1995**, *72*, 201-8.
- [77] Romeo, D.; Skerlavaj, B.; Bolognesi, M.; Gennaro, R. *J Biol Chem*, **1988**, *263*, 9573-5.
- [78] Hase, K.; Eckmann, L.; Leopard, J. D.; Varki, N.; Kagnoff, M. F. *Infect Immun*, **2002**, *70*, 953-63.
- [79] Koczulla, R.; von Degenfeld, G.; Kupatt, C.; Krotz, F.; Zahler, S.; Gloe, T.; Issbrucker, K.; Unterberger, P.; Zaiou, M.; Lebherz, C.; Karl, A.; Raake, P.; Pfosser, A.; Boekstegers, P.; Welsch, U.; Hiemstra, P. S.; Vogelmeier, C.; Gallo, R. L.; Clauss, M.; Bals, R. *J Clin Invest*, **2003**, *111*, 1665-72.
- [80] Davidson, D. J.; Currie, A. J.; Reid, G. S.; Bowdish, D. M.; MacDonald, K. L.; Ma, R. C.; Hancock, R. E.; Speert, D. P. *J Immunol*, **2004**, *172*, 1146-56.
- [81] Yu, J.; Mookherjee, N.; Wee, K.; Bowdish, D. M.; Pisticolic, J.; Li, Y.; Rehaume, L.; Hancock, R. E. *J Immunol*, **2007**, *179*, 7684-91.
- [82] Mookherjee, N.; Brown, K. L.; Bowdish, D. M.; Doria, S.; Falsafi, R.; Hokamp, K.; Roche, F. M.; Mu, R.; Doho, G. H.; Pisticolic, J.; Powers, J. P.; Bryan, J.; Brinkman, F. S.; Hancock, R. E. *J Immunol*, **2006**, *176*, 2455-64.
- [83] Hooper, L. V.; Stappenbeck, T. S.; Hong, C. V.; Gordon, J. I. *Nat Immunol*, **2003**, *4*, 269-73.
- [84] Saxena, S. K.; Rybak, S. M.; Davey, R. T., Jr.; Youle, R. J.; Ackerman, E. J. *J Biol Chem*, **1992**, *267*, 21982-6.
- [85] Dieckgraefe, B. K.; Crimmins, D. L.; Landt, V.; Houchen, C.; Anant, S.; Porche-Sorbet, R.; Ladenson, J. H. *J Investig Med*, **2002**, *50*, 421-34.
- [86] Porter, E. M.; Bevins, C. L.; Ghosh, D.; Ganz, T. *Cell Mol Life Sci*, **2002**, *59*, 156-70.

- [87] Putsep, K.; Axelsson, L. G.; Boman, A.; Midtvedt, T.; Normark, S.; Boman, H. G.; Andersson, M. *J Biol Chem*, **2000**, *275*, 40478-82.
- [88] Mallow, E. B.; Harris, A.; Salzman, N.; Russell, J. P.; DeBerardinis, R. J.; Ruchelli, E.; Bevins, C. L. *J Biol Chem*, **1996**, *271*, 4038-45.
- [89] Hornef, M. W.; Putsep, K.; Karlsson, J.; Refai, E.; Andersson, M. *Nat Immunol*, **2004**, *5*, 836-43.
- [90] O'Neil, D. A.; Porter, E. M.; Elewaut, D.; Anderson, G. M.; Eckmann, L.; Ganz, T.; Kagnoff, M. F. *J Immunol*, **1999**, *163*, 6718-24.
- [91] Sherman, H.; Chapnik, N.; Froy, O. *Mol Immunol*, **2006**, *43*, 1617-23.
- [92] Zaalouk, T. K.; Bajaj-Elliott, M.; George, J. T.; McDonald, V. *Infect Immun*, **2004**, *72*, 2772-9.
- [93] Dann, S. M.; Eckmann, L. *Curr Opin Gastroenterol*, **2007**, *23*, 115-20.
- [94] Fahlgren, A.; Hammarstrom, S.; Danielsson, A.; Hammarstrom, M. L. *Clin Exp Immunol*, **2004**, *137*, 379-85.
- [95] Drozdov, I.; Modlin, I. M.; Kidd, M.; Goloubinov, V. V. *Neuroendocrinology*, **2008**.
- [96] Kuramoto, H.; Kadowaki, M.; Sakamoto, H.; Yuasa, K.; Todo, A.; Shirai, R. *Arch Histol Cytol*, **2007**, *70*, 235-41.
- [97] Hansen, M. B.; Witte, A. B. *Acta Physiol (Oxf)*, **2008**.
- [98] Schafermayer, A.; Zanner, R.; Gratzl, M.; Sachs, G.; Prinz, C. In *Cell Biology of the Chromaffin Cell*; R. Borges; L. Gandia, eds., **2004**.
- [99] Heitz, P.; Polak, J. M.; Timson, D. M.; Pearse, A. G. *Histochemistry*, **1976**, *49*, 343-7.
- [100] Cetin, Y.; Grube, D. *Cell Tissue Res*, **1991**, *264*, 231-41.
- [101] Raikhlin, N. T.; Kvetnoy, I. M. *Acta Histochem*, **1976**, *55*, 19-24.
- [102] Kim, M.; Cooke, H. J.; Javed, N. H.; Carey, H. V.; Christofi, F.; Raybould, H. E. *Gastroenterology*, **2001**, *121*, 1400-6.
- [103] Braun, T.; Voland, P.; Kunz, L.; Prinz, C.; Gratzl, M. *Gastroenterology*, **2007**, *132*, 1890-901.
- [104] Modlin, I. M.; Kidd, M.; Pfragner, R.; Eick, G. N.; Champaneria, M. C. *J Clin Endocrinol Metab*, **2006**, *91*, 2340-8.
- [105] Yamamoto-Furusho, J. K.; Korzenik, J. R. *World J Gastroenterol*, **2006**, *12*, 6751-5.
- [106] Netea, M. G.; Ferwerda, G.; de Jong, D. J.; Jansen, T.; Jacobs, L.; Kramer, M.; Naber, T. H.; Drenth, J. P.; Girardin, S. E.; Kullberg, B. J.; Adema, G. J.; Van der Meer, J. W. *J Immunol*, **2005**, *174*, 6518-23.
- [107] Shi, J. *Inflamm Bowel Dis*, **2007**, *13*, 1284-92.
- [108] Fellermann, K.; Wehkamp, J.; Herrlinger, K. R.; Stange, E. F. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, **2003**, *15*, 627-34.
- [109] Wehkamp, J.; Harder, J.; Weichenthal, M.; Schwab, M.; Schaffeler, E.; Schlee, M.; Herrlinger, K. R.; Stallmach, A.; Noack, F.; Fritz, P.; Schroder, J. M.; Bevins, C. L.; Fellermann, K.; Stange, E. F. *Gut*, **2004**, *53*, 1658-64.
- [110] Lewin, K. *Ann R Coll Surg Engl*, **1969**, *44*, 23-37.
- [111] Ahmad, T.; Armuzzi, A.; Bunce, M.; Mulcahy-Hawes, K.; Marshall, S. E.; Orchard, T. R.; Crawshaw, J.; Large, O.; de Silva, A.; Cook, J. T.; Barnardo, M.; Cullen, S.; Welsh, K. I.; Jewell, D. P. *Gastroenterology*, **2002**, *122*, 854-66.
- [112] Ogura, Y.; Lala, S.; Xin, W.; Smith, E.; Dowds, T. A.; Chen, F. F.; Zimmermann, E.; Tretiakova, M.; Cho, J. H.; Hart, J.; Greenson, J. K.; Keshav, S.; Nunez, G. *Gut*, **2003**, *52*, 1591-7.

- [113] Hisamatsu, T.; Suzuki, M.; Reinecker, H. C.; Nadeau, W. J.; McCormick, B. A.; Podolsky, D. K. *Gastroenterology*, **2003**, *124*, 993-1000.
- [114] Braat, H.; Peppelenbosch, M. P.; Hommes, D. W. *Ann N Y Acad Sci*, **2006**, *1072*, 135-54.
- [115] Desreumaux, P.; Ernst, O.; Geboes, K.; Gambiez, L.; Berrebi, D.; Muller-Alouf, H.; Hafraoui, S.; Emilie, D.; Ectors, N.; Peuchmaur, M.; Cortot, A.; Capron, M.; Auwerx, J.; Colombel, J. F. *Gastroenterology*, **1999**, *117*, 73-81.
- [116] Ghia, J. E.; Blennerhassett, P.; Collins, S. M. *J Clin Invest*, **2008**, *118*, 2209-18.
- [117] Ghia, J. E.; Blennerhassett, P.; El-Sharkawy, R. T.; Collins, S. M. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, **2007**, *293*, G711-8.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

Structural Determinants of Antimicrobial and Antiplasmodial Activity and Selectivity in Histidine-rich Amphipathic Cationic Peptides

A. James MASON, Wardi MOUSSAOUI, Tamer ABDELRAHMAN, Alyae BOUKHARI, Philippe BERTANI, Arnaud MARQUETTE, Peiman SHOOSHTARIZADEH, Gilles MOULAY, Nelly BOEHM, Bernard GUEROLD, Ruairidh J. H. SAWERS, Antoine KICHLER, Marie-Hélène METZ-BOUTIGUE, Ermanno CANDOLFI, Gilles PREVOST, and Burkhard BECHINGER

Journal of Biological Chemistry, 2009, vol. 284, n° 1, pages 119-133

Annexe 4 :

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

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/doi:10.1074/jbc.M806201200>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Abstract

Chromogranins are the major proteins present in the secretory granules of the adrenomedullary chromaffin cells. There exist several potential proteolytic cleavage sites at pairs of basic amino acids in chromogranins sequence, allowing the generation of several derived peptides. Different post translational modifications (glycosylation, phosphorylation and sulfatation) have been characterized in chromogranins. These modifications modulate the proteolytic degradation as well as the biological activities of these peptides. Several chromogranins, A and B (CGA, CGB), and ubiquitin (Ub) derived peptides have been shown to have antimicrobial properties against different microorganisms (bacteria, fungi and parasites).

In this work, the ubiquitination of chromogranins was characterized. It was shown that ubiquitin-activating enzyme (E1) is present in the matrix and membrane of secretory chromaffin granules. The association between CGA and Ub was shown using proteomic analysis and Bio-Plex technique. Moreover, an evolutionary well conserved *Ubiquitin Interacting Motif* (UIM) was found in the C-terminal part of CGA. These findings suggest that CGA takes part in the ubiquitination machinery present on the membrane of chromaffin granules.

In the second part, the proteolysis of the proteic content of the matrix of the chromaffin granules by V8 protease from *Staphylococcus aureus* was investigated. New CGA and CGB derived peptides were identified and some of them were shown to exhibit antimicrobial (mainly antifungal) properties but none of them was found to be active against *S. aureus*.

These findings suggest a new mechanism of subversion of the host innate immune system in which the pathogen's virulence factors are involved in the generation of new antimicrobial agents.

Keywords : Adrenal medulla, Chromogranins, Ubiquitin, *Staphylococcus aureus*, Antimicrobial peptides, Innate immunity.

Résumé

L'analyse du matériel protéique contenu dans les granules de sécrétion des cellules chromaffines et sécrété avec les catécholamines dans les états de stress a été effectué. Notre intérêt s'est plus particulièrement porté sur les chromogranines et l'ubiquitine. Les chromogranines sont les protéines majoritaires de la matrice des granules de sécrétion des cellules chromaffines de la médullo-surrénale. Leur séquence possède plusieurs sites multibasiques qui sont des cibles de clivage potentiel par les enzymes protéolytiques et elles possèdent de nombreuses modifications post-traductionnelles (glycosylation, phosphorylation et sulfatation) qui peuvent moduler la dégradation protéolytique et les activités biologiques des peptides qui en sont issus. Plusieurs peptides dérivés des chromogranines A et B (CGA, CGB) aussi que de l'ubiquitine (Ub) possèdent une activité antimicrobienne contre différents microorganismes (bactéries, champignons, levures et parasites).

Dans une première partie, nous avons recherché la présence de chromogranines ubiquitynilées. Mes recherches ont permis de démontrer la présence du premier enzyme de la voie d'ubiquitination, l'*ubiquitin-activating enzyme* (E1) au niveau de la matrice et de la membrane des granules chromaffines. L'association de l'ubiquitine avec la CGA a été démontrée par analyse protéomique et la technique Bio-Plex. Nous avons ensuite montré que la partie C-ter de la CGA possède un site de reconnaissance à l'ubiquitine (*Ubiquitine Interacting Motif, UIM*) très conservé au cours de l'évolution. Ce nouveau résultat suggère que la CGA participe à la machinerie d'ubiquitination présente sur la membrane des granules chromaffines.

Dans une seconde partie, la protéolyse par la protéase V8 de *Staphylococcus aureus* du contenu protéique des granules chromaffines a été analysée. De nouveaux peptides principalement issus de la CGA et de la CGB dont l'activité antimicrobienne a été caractérisée ont été identifiés. Les peptides générés présentent principalement des activités antifongiques, mais aucun peptide n'a été trouvé actif contre *S. aureus*.

Ces observations permettent de proposer un mécanisme nouveau et inattendu de subversion du système immunitaire inné de l'hôte par un facteur de virulence du pathogène de génération de nouveaux agents antimicrobiens.

Mots-clés : Médullo-surrénale, chromogranines, Ubiquitine, *Staphylococcus aureus*, Peptides antimicrobiens, Immunité innée.