

BENOÎT CHAMPAGNE

PROTÉOLYSE DE ICAM-1 PAR L'ÉLASTASE DE LEUCOCYTE

Mémoire
présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M. Sc.) en virologie et immunologie

Avril 1999
INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
Université du Québec

Les résultats présentés dans ce mémoire ont été en partie publiés et communiqués sous la forme suivante :

Publication :

Champagne, B., Tremblay, P., Cantin, A., St-Pierre, Y. 1998. Proteolytic cleavage of ICAM-1 by Human Neutrophil Elastase. *J Immunol* **161** :6398-6405. (Voir Annexe)

Communication :

Champagne, B., Tremblay, P., St-Pierre, Y. Proteolytic cleavage of ICAM-1 by Human Neutrophil Elastase. 12^{ème} réunion de printemps de la Société Canadienne d'Immunologie, 13-16 mars 1998. St-Adèle, Québec.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	III
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	V
LISTE DES FIGURES.....	VII
SOMMAIRE.....	VIII
INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
1.0 ICAM-1.....	5
1.1 <i>Propriétés physico-chimiques</i>	5
1.1.1 Structure générale.....	5
1.1.2 Glycosylation.....	9
1.1.3 Dimérisation.....	9
1.1.4 Association avec le cytosquelette.....	10
1.1.5 Ligands.....	10
1.1.6 Isoformes.....	11
1.1.7 Formes solubles.....	12
1.2 <i>Expression cellulaire et distribution tissulaire</i>	13
1.3 <i>Rôle biologique</i>	14
1.3.1 Interaction leucocyte/cellule endothéliale.....	15
1.3.2 Activation des lymphocytes T.....	16
2.0 ÉLASTASE DE LEUCOCYTES.....	17
2.1 <i>Structure</i>	17
2.2 CELLULES PRODUCTRICES DE HLE.....	21
2.3 <i>Substrats</i>	21
2.4 <i>Régulation de l'activité enzymatique de HLE</i>	22
2.5 <i>Formes membranaires de HLE</i>	23
2.6 <i>Pathophysiologie</i>	23
HYPOTHÈSE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS GÉNÉRAUX.....	26
APPROCHE EXPÉRIMENTALE.....	28
1.1 PROTÉASES ET INHIBITEURS DE PROTÉASES.....	29
1.1.1 <i>Élastase de leucocyte (HLE)</i>	29
1.1.2 <i>Gélatinase B (MMP-9)</i>	29
1.1.3 <i>Trypsine et chymotrypsine bovines</i>	29
1.1.4 <i>α1-antitrypsine (α1-AT) et MSAAPVCK</i>	29
1.1.5 <i>Échantillons de lavages bronchoalvéolaires (BAL) de patients atteints de FK29</i>	
1.2 ANTICORPS MONOCLONAUX.....	30
1.3 LIGNÉES CELLULAIRES.....	30
1.4 CULTURE CELLULAIRE.....	30
1.5 CLIVAGE DES MOLÉCULES DE SURFACE PAR HLE.....	30
1.6 RÉEXPRESSION DE ICAM-1 SUITE À UN CLIVAGE MEMBRANAIRE.....	31
1.7 ANALYSE DE LA PROTÉOLYSE DE rsICAM-1 PAR HLE.....	31
1.8 ANALYSE ÉLECTROPHORÉTIQUE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRÉSENCE DE DODÉCYLSULPHATE DE SODIUM (SDS-PAGE).....	32
1.8.1 <i>Préparation des gels</i>	32
1.8.2 <i>Coloration des protéines</i>	32
1.8.2.1 <i>Bleu de Coomassie</i>	32

1.8.2.2 SYPRO-RED	32
1.8.3 Analyse densitométrique	33
1.9 CLIVAGE MEMBRANAIRE DE ICAM-1 DANS DES LIQUIDES BAL DE PATIENTS ATTEINTS DE FK	33
1.10 ANALYSE PAR CYTOFLUOMÉTRIE EN FLUX	33
1.11 DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ GÉLATINOLYTIQUE DE MMP-9 PAR DIGESTION ENZYMATIQUE DE GÉLATINE FLUORESCENTE ADSORBÉE SUR DES MICROSPHÈRES DE POLYÉTHYLÈNE	34
1.12 MESURE DE L'ACTIVITÉ HLE CONTENUE DANS DES LIQUIDES BAL	34
RÉSULTATS.....	35
1.0 RÉSULTATS OBTENUS AVEC DIFFÉRENTES LIGNÉES CELLULAIRES HUMAINES	36
1.1 Protéolyse de ICAM-1 par l'élastase de leucocyte (HLE).....	36
1.2 Inhibition de la baisse d'expression de ICAM-1 induite par HLE en présence d'inhibiteurs de protéases.....	39
1.2.1 α 1-antitrypsine (α 1-AT).....	39
1.2.2 MSAAPVCK	40
1.2.3 Sérum humain et sérum fœtal de veau (SFV)	40
1.3 Analyse de l'expression de ICAM-1 sur différentes lignées cellulaires humaines prétraitées avec HLE	49
1.4 Cinétique du clivage de ICAM-1 par HLE	52
1.5 Réexpression de ICAM-1 suite à une protéolyse membranaire.....	55
1.6 Aspects spécificités du clivage protéolytique de ICAM-1 par HLE.....	58
1.6.1 Évaluation de la protéolyse de ICAM-1 par MMP-9.....	58
1.6.2 Sensibilité respective des molécules ICAM-1, CD4 et HLA-DR à la protéolyse par HLE.....	58
1.6.3 Inhibition de la protéolyse de ICAM-1 par HLE à l'aide d'un AcM dirigé contre le domaine N-terminal de ICAM-1	59
2.0 RÉSULTATS OBTENUS À L'AIDE D'UNE FORME RECOMBINANTE SOLUBLE DE ICAM-1 (rsICAM-1)	68
2.1 Évaluation de la protéolyse de rsICAM-1 par HLE	68
2.2 Effet de la N-glycosylation de rsICAM-1 sur son clivage par HLE	68
2.3 Effet de l'acide sialique de rsICAM-1	69
3.0 RÉSULTATS OBTENUS AVEC DES FLUIDES DE LAVAGES BRONCHOALVÉOLAIRES (BAL) DE PATIENTS ATTEINTS DE FIBROSE KYSTIQUE (FK)	77
3.1 Mesure de l'activité HLE contenue dans des échantillons de fluides bronchoalvéolaires	77
3.2 Inhibition de la protéolyse membranaire de ICAM-1 et de CD4 par des fluides BAL de patients atteints de FK en présence d'inhibiteurs de HLE	77
DISCUSSION	83
1.1 Protéolyse partielle ou complète de ICAM-1 et conséquences fonctionnelles	84
1.2 Facteurs intrinsèques et extrinsèques pouvant affecter la protéolyse de ICAM-1	86
1.3 Signification biologique du clivage membranaire de ICAM-1 par HLE.....	87
1.4 Implications pathophysiologiques du clivage membranaire de ICAM-1 par HLE	89
CONCLUSION	92
REMERCIEMENTS	95
BIBLIOGRAPHIE.....	97
ANNEXE.....	111

LISTE DES ABRÉVIATIONS

a.a.	acide aminé
Ac	anticorps
AcM	anticorps monoclonaux
ADN	acide déoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique de type messenger
BAL	« bronchoalveolar lavage »
CD	« cluster of differentiation »
CMH-II	complexe majeur d'histocompatibilité de classe II
D.O.	densité optique
ECM	« extracellular matrix »
FK	fibrose kystique
HLA	« human leukocyte antigen »
HLE	« human leukocyte elastase »
ICAM-1	« intercellular cell adhesion molecule-1 »
IFN- γ	interféron de type gamma
Ig	immunoglobuline
IL	interleukine
kDa	kiloDalton
M	molaire
mL	millilitre
mM	millimolaire
MMP-9	« matrix metalloproteinase-9 »
p/v	poids sur volume
PBS	« phosphate buffered saline »
PMA	12-phorbol 13-myristate acétate
PMN	polymorphonucléaire
rpm	rotation par minute
rsICAM-1	ICAM-1 soluble recombinant
SDS-PAGE	« sodium docecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis »
SFV	sérum foetal de veau
sICAM-1	ICAM-1 soluble
TcR	« T cell receptor »

TNF	« tumor necrosis factor »
v/v	volume sur volume
°C	degré Celsius
μL	microlitre

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure schématique de ICAM-1.....	7
Figure 2: Structure tridimensionnelle de HLE.....	19
Figure 3: Effet de différentes concentrations de HLE sur l'expression membranaire de ICAM-1.....	37
Figure 4: Inhibition de la protéolyse de ICAM-1 par HLE en présence de l'inhibiteur naturel α 1-antitrypsine (α 1-AT).....	41
Figure 5: Analyse de la formation des complexes α 1-AT/HLE.....	43
Figure 6: Inhibition de la protéolyse de ICAM-1 par HLE en présence de l'inhibiteur peptidique MSAAPVCK.	45
Figure 7: Inhibition de la protéolyse de ICAM-1 par HLE en présence de sérum humain ou de SFV.	47
Figure 8: Protéolyse membranaire de ICAM-1 par HLE sur différentes lignées cellulaires humaines.	50
Figure 9: Cinétique du clivage membranaire de ICAM-1 par HLE.	53
Figure 10: Réexpression de ICAM-1 suite à une protéolyse membranaire.	56
Figure 11: Évaluation de la protéolyse de ICAM-1 par MMP-9.	60
Figure 12: Évaluation de la protéolyse de ICAM-1, CD4, et de HLA-DR par HLE.....	62
Figure 13: Évaluation de la protéolyse de ICAM-1, CD4 et HLA-DR par la trypsine et chymotrypsine bovines.	64
Figure 14: Inhibition de la protéolyse de ICAM-1 par HLE à l'aide d'un AcM dirigé contre le domaine N-terminal de ICAM-1.....	66
Figure 15: Protéolyse de rsICAM-1 par HLE.....	71
Figure 16: Effet de la N-glycosylation sur la sensibilité de rsICAM-1 au clivage par HLE.....	73
Figure 17: Effet de l'acide sialique sur le clivage de rsICAM-1 par HLE.	75
Figure 18: Mesure de l'activité HLE contenue dans des liquides BAL provenant de patients atteints de FK.....	79
Figure 19: Inhibition de la protéolyse membranaire de ICAM-1 et de CD4 dans des liquides BAL en présence d'inhibiteurs de HLE.	81

SOMMAIRE

L'élastase de leucocyte (HLE; « human leukocyte elastase ») est une sérine protéase qui est impliquée dans la pathogenèse de plusieurs maladies inflammatoires telles l'arthrite rhumatoïde, la fibrose kystique (FK; « cystic fibrosis ») et l'emphysème pulmonaire. Puisque HLE a été montrée comme étant capable de se lier à Mac-1, un ligand de ICAM-1 (« intercellular adhesion molecule-1 »; CD54), et que ICAM-1 joue un rôle clé durant le recrutement et l'activation des leucocytes aux sites inflammés, nous avons investigué la capacité de HLE à cliver ICAM-1. Des analyses de cytofluométrie réalisées à l'aide de différents AcM contre ICAM-1 ont montré un clivage dose-dépendant de ICAM-1 par HLE sur différentes lignées cellulaires humaines. Cette protéolyse membranaire a complètement été inhibée par α 1-antitrypsine (α 1-AT), le principal inhibiteur naturel de HLE. La liaison d'un AcM dirigé contre le domaine N-terminal de ICAM-1 (i.e. D1) a également complètement inhibé la protéolyse de ICAM-1 par HLE, suggérant la nécessité d'une liaison de HLE au niveau ou à proximité du domaine D1 de ICAM-1. La capacité de HLE à pouvoir effectuer la protéolyse directe de ICAM-1 a été confirmée par des analyses électrophorétiques de type SDS-PAGE en utilisant une forme recombinante soluble de la partie extracellulaire de ICAM-1 (rsICAM-1). Fait surprenant, les nombreux oligosaccharides qui recouvraient la surface de rsICAM-1 ne semblaient pas conférer une protection accrue envers l'activité catalytique de HLE suggérant que la glycosylation de ICAM-1 ne jouait probablement pas un rôle crucial au niveau de sa protéolyse par HLE. Nous avons également montré que les sécrétions bronchoalvéolaires (BAL; « bronchoalveolar lavage ») de patients atteints de FK contenait une activité protéolytique nette suffisamment importante pour induire la protéolyse membranaire de ICAM-1. Ce clivage induit par l'incubation de cellules dans des liquides BAL a complètement été inhibé par l'ajout de α 1-AT ou d'un inhibiteur peptidique et spécifique contre le site catalytique de HLE (MSAAPVCK; N-méthoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val chlorométhyl cétone). De plus, la protéolyse de ICAM-1 induite par ces liquides biologiques était concomitante avec celle de CD4 à la surface de ces mêmes cellules, selon une amplitude équivalente. La capacité de HLE de pouvoir moduler l'expression de ICAM-1 à la surface des leucocytes par clivage protéolytique vient donc supporter l'hypothèse qu'une surproduction de HLE pourrait entraîner de sévères désordres immunitaires au niveau des poumons de patients atteint de FK ou d'emphysème pulmonaire en affectant les processus d'adhésion et d'activation leucocytaire.

INTRODUCTION

Plusieurs molécules membranaires de fonctions diverses sont la cible de protéases endogènes ou exogènes. Des fragments solubles de leur partie extracellulaire sont par conséquent relâchés dans le milieu extracellulaire. Ce processus de protéolyse membranaire pourrait jouer un rôle important pendant l'extravasation des leucocytes au niveau de leur détachement (déadhésion) de l'endothélium vasculaire. Le flot constant de publications rapportant de nouvelles molécules relâchées de la surface cellulaire par clivage enzymatique et la présence de leur contrepartie soluble dont la concentration tend à augmenter dans différents états inflammatoires dans le plasma sanguin, indique que ce processus de protéolyse membranaire aurait une importance physiologique et pathophysiologique (Gearing et Newman, 1993; Bazil, 1995). Étant donné que l'expression membranaire de plusieurs molécules d'adhésion de leucocytes a été rapportée comme étant régulée par clivage enzymatique (Ehlers *et al.*, 1991; Bazil, 1995), ce mécanisme de régulation pourrait donc avoir des conséquences majeures dans divers processus immunitaires impliquant l'interaction des leucocytes avec d'autres cellules ou constituants de la matrice extracellulaire. Cependant, dans la plupart des cas, les protéases impliquées n'ont présentement pas été identifiées.

Les diverses sérines protéases neutres entreposées dans les granules primaires des neutrophiles (PMN), puis relâchées suite à leur activation, sont parmi les protéases cellulaires susceptibles de prendre part au clivage physiologique de molécules de surface de leucocytes. L'élastase de leucocyte (HLE; E.C. 3.4.21.11) et la cathepsine G (E.C. 3.4.21.20) sont les principales sérines protéases sécrétées par les PMN; elles ont été rapportées comme jouant un rôle important dans les événements protéolytiques médiés par les PMN (Travis, 1988). Ces deux protéases sont également retrouvées au niveau de la surface des PMN (au repos ou activés) sous forme associée de façon non-covalente à la membrane cytoplasmique (Owen, 1995). Leur expression n'est pas restreinte aux PMN, et des formes solubles et membranaires ont également été rapportées chez les monocytes et les lymphocytes (Campbell *et al.*, 1989; Bristow *et al.*, 1991). HLE a reçu une attention bien particulière durant ces deux dernières décennies étant donné qu'elle serait le principal médiateur responsable de la destruction tissulaire qui caractérise de nombreux désordres immunitaires et inflammatoires tels l'arthrite rhumatoïde, la fibrose kystique et l'emphysème pulmonaire (Travis, 1988; Döring, 1994). En plus de sa capacité à pouvoir digérer de nombreuses macromolécules de la matrice extracellulaire, HLE peut également effectuer la protéolyse membranaire de certains antigènes de surface tels CD4 et CD8 (Döring *et al.*, 1995), CD43 (Remold-O'Donnell et Parent, 1995), et le récepteur de thrombine (Renesto *et al.*, 1997). Cependant, afin qu'un tel clivage protéolytique puisse

se produire *in vivo*, des conditions microenvironnementales favorables sont requises afin de limiter l'inhibition rapide de HLE par les nombreux inhibiteurs naturels présents dans le milieu extracellulaire. Il a été démontré *in vitro* qu'une protéolyse extracellulaire pouvait effectivement se produire en présence de concentrations physiologiques d'inhibiteurs de protéases lors d'un intime contact des PMN envers une surface adsorbée de substrats (Liou et Campbell, 1996), confinant ainsi l'activité protéolytique au niveau de la zone de contact péricellulaire des PMN où ce microenvironnement temporaire protégeait l'activité catalytique de HLE de l'inhibition. L'importance que jouerait les protéases durant l'adhésion cellulaire est également supportée par de récentes observations qui montrent la capacité de certains récepteurs de molécules d'adhésion à pouvoir lier HLE. Ainsi, Cai et Wright (1996) ont démontré que Mac-1 (CD11b/CD18; CR3) était l'un des récepteurs présent à la surface des PMN capable de lier spécifiquement HLE. Ils ont également montré que i) les niveaux d'expression membranaire de HLE à la surface des PMN étaient inversement proportionnels à leur pouvoir d'adhésion, et ii) qu'un AcM contre HLE peut prévenir le détachement des PMN d'une surface adsorbée de fibrinogène, indiquant alors que HLE était impliquée dans les interactions cellulaires des PMN et qu'elle pourrait potentiellement agir comme facteur de régulation au niveau des adhésions cellulaires médiées par Mac-1. Il est également possible que des protéases telles HLE pourraient être importantes au niveau du détachement des PMN en clivant directement des ligands liés à Mac-1 puisqu'un rôle de HLE durant l'extravasation des PMN a été rapporté par Woodman *et al.* (1993). Ces auteurs ont en effet montré que l'infiltration de PMN à travers les vaisseaux sanguins inflammés, telle qu'observée *in vivo* par microscopie intravitale, a significativement été abrogée par l'injection d'un inhibiteur de HLE de faible masse moléculaire. Puisque les interactions médiées par ICAM-1 ont été montrées comme étant critiques durant l'attachement ferme des PMN au niveau des cellules endothéliales (van de Stolpe et van der Saag, 1996), et étant donné que Mac-1 (un récepteur de ICAM-1) a été montrée capable de lier HLE (Cai et Wright, 1996), nous avons donc évalué la sensibilité de ICAM-1 au clivage protéolytique médié par HLE.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1.0 ICAM-1

Les molécules d'adhésions jouent un rôle clé dans les processus d'adhésion et de reconnaissance cellulaire qui prennent part dans de nombreux événements physiologiques ou pathophysiologiques tels l'embryogenèse, le développement de la réponse immunitaire et inflammatoire, et la carcinogenèse. La liaison de ces molécules avec d'autres antigènes de surface ou constituants de la matrice extracellulaire (ECM; « extracellular matrix ») permet entre autre de consolider les liens intercellulaires tout en facilitant les processus de motilité et de migration cellulaire.

Les intégrines, la superfamille des immunoglobulines (Ig), et les sélectines sont trois familles majeures de molécules d'adhésion qui jouent un rôle déterminant au niveau du développement de la réponse immunitaire et inflammatoire. La revue de littérature qui suit va être principalement consacrée sur ICAM-1, un membre important de la superfamille des Ig. Ces propriétés physico-chimiques et biologiques seront discutées et passées en revue.

1.1 Propriétés physico-chimiques

1.1.1 Structure générale

ICAM-1 est une glycoprotéine transmembranaire qui appartient à la superfamille des immunoglobulines (Ig). La forme commune de ICAM-1 est composée de cinq domaines d'Ig (D1-D5) dont certains sont similaires à ceux retrouvés pour ICAM-2 (CD102), ICAM-3 (CD50) et ICAM-4 (LW) (Staunton *et al.*, 1989; Fawcett *et al.*, 1992; Fougerolles *et al.*, 1992; Bailly *et al.*, 1994 et 1995). ICAM-1 présente également plusieurs séquences d'homologies avec d'autres membres de la superfamille des Ig tels NCAM-1 (CD56) et la télencéphaline (ICAM-5) qui sont deux molécules d'adhésion du système nerveux (Simmons *et al.*, 1988; Tian *et al.*, 1997). La molécule ICAM-1 a été clonée chez la souris (Siu *et al.*, 1989), le rat (Kita *et al.*, 1992) et le chien (Manning *et al.*, 1995); leur ADNc montrent des homologies partielles avec la séquence humaine (55-65%). Le gène de ICAM-1 humain est constitué de sept exons qui sont entrecoupés par six introns. Chacun des cinq domaines d'Ig est individuellement codé par un exon (Voraberger *et al.*, 1991).

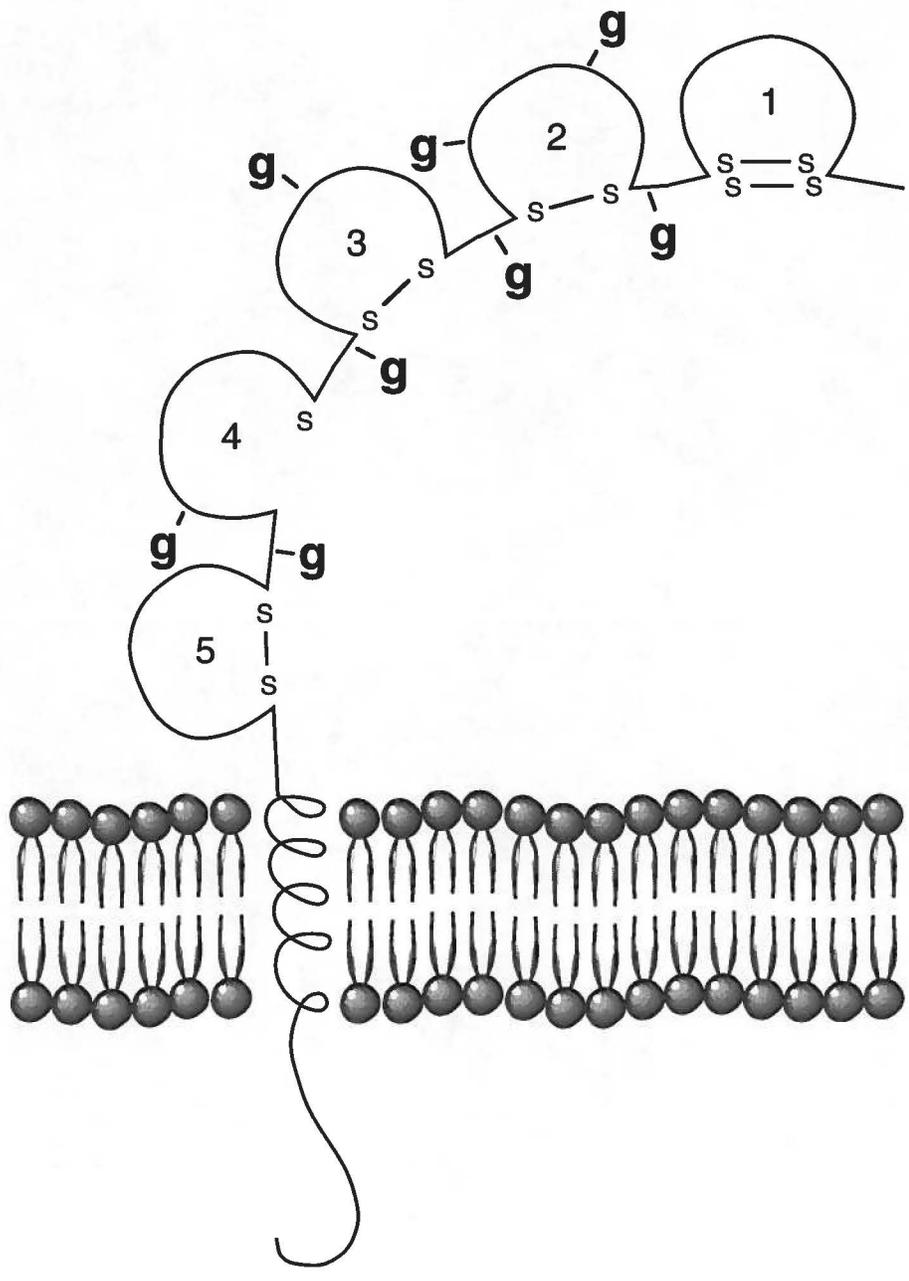
La séquence peptidique de ICAM-1 contient 505 a.a. (acide aminé) et est divisée en trois régions distinctes: une partie extracellulaire constituée de 453 a.a. majoritairement hydrophiles, une région transmembranaire hydrophobe (24 a.a.) et une queue

cytoplasmique chargée (28 a.a.) (Staunton *et al.*, 1988). La partie extracellulaire est caractérisée par un alignement en série de cinq domaines d'Ig (D1 à D5; D1 étant le domaine N-terminal). Chacun des domaines d'Ig est caractérisé par: i) une séquence de 90-100 acides aminés; ii) deux feuillets formés de brins β anti-parallèles, et iii) des résidus cystéines localisés au niveau des brins B et F β qui stabilisent leur structure tertiaire en formant des ponts disulfures. Par exception, le résidu cystéine du brin F β de D4 est remplacé par une leucine, un a.a. hydrophobe, qui stabiliserait possiblement D4 (Staunton *et al.*, 1988). Par ailleurs, deux cystéines additionnelles (brins E et G β) pourraient également substituer le résidu cystéine manquant du brin F β de D4. (Staunton *et al.*, 1988).

La structure tridimensionnelle complète de ICAM-1 n'est présentement pas connue. Cependant, celles d'un fragment de 190 a.a. comprenant ses deux premiers domaines extracellulaires (D1-D2) a récemment été déterminée par cristallographie à une résolution de 3.0-Å (Casasnovas *et al.*, 1998). L'étude de ces fragments a révélé la présence d'une interface hydrophobe, au niveau du domaine D1, impliquée dans l'homodimérisation de ICAM-1. Ces résultats confirmaient donc d'autres travaux rapportant l'homodimérisation de ICAM-1 à la surface cellulaire (voir section « 1.1.3 Dimérisation » pour plus de détails).

L'observation par microscopie électronique de molécules ICAM-1 purifiées a également révélé que la molécule se présentait sous une forme linéaire d'une longueur et largeur approximative de 19 nm et de 2-3 nm consistant avec un alignement complet et en série des domaines extracellulaires (Staunton *et al.*, 1990). De plus, une région charnière (« hinged rod ») est également notée au centre de ICAM-1, c'est-à-dire, entre ses domaines D3 et D4; celle-ci accorderait une certaine flexibilité à l'extrémité extracellulaire N-terminale de ICAM-1.

Figure 1: Structure schématique de ICAM-1.



1.1.2 Glycosylation

La partie extracellulaire de ICAM-1 est différenciellement glycosylée dépendamment des types cellulaires qui l'expriment, ce qui explique que l'hétérogénéité de sa masse moléculaire peut fluctuer entre 76 à 114 kDa (Dustin *et al.*, 1986, Rothlein *et al.*, 1986, Staunton *et al.*, 1988). La déglycosylation de ICAM-1 résulte en une protéine de 55 kDa (Dustin *et al.*, 1986, Staunton *et al.*, 1988). La glycosylation peut donc constituer 30 à 50 pour cent de la masse moléculaire totale de ICAM-1. Cette glycosylation différentielle est principalement due aux nombreux sites de N-glycosylation (8 en tout) qui sont retrouvés sur la partie extracellulaire de ICAM-1. Ces sites sont localisés tout au long des domaines D2, D3 et D4 (Bloom *et al.*, 1996); le domaine N-terminal de ICAM-1 (D1) ainsi que son domaine membrane-basal (D5) ne sont pas glycosylés. Les oligosaccharides de ICAM-1 possèdent différentes tailles pouvant présenter des structures moléculaires fort complexes (Bloom *et al.*, 1996). De nombreux résidus d'acide sialique sont également présents au niveau des extrémités oligosaccharidiques terminales (Dustin *et al.*, 1986, Staunton *et al.*, 1988; Bloom *et al.*, 1996).

L'hétérogénéité de la glycosylation de ICAM-1 pourrait possiblement avoir d'importantes répercussions sur la structure globale de son squelette polypeptidique et ainsi diversifier ses fonctions biologiques.

1.1.3 Dimérisation

La dimérisation de ICAM-1 à la surface des cellules a initialement été proposée par Staunton *et al.* (1988) puisque des résidus cystéines libres, localisés à proximité de la zone d'enclassement, suggéraient la formation de ponts disulfures intermoléculaires. Des homodimères de ICAM-1 ont ensuite pu être mis en évidence en établissant des liens covalents entre ceux-ci ce qui a donc permis de les visualiser clairement par SDS-PAGE (Reilly *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 1995). Le domaine transmembranaire de ICAM-1 qui contient un motif de dimérisation ne serait pas la seule région impliquée dans la dimérisation de ICAM-1 puisque des fragments ICAM-1 contenant uniquement les deux premiers domaines extracellulaires (D1-D2) ont également la capacité de dimériser (Casasnovas *et al.*, 1998). La structure tridimensionnelle des deux premiers domaines extracellulaires de ICAM-1 (D1-D2) a en effet révélée la présence d'une interface hydrophobe dans le domaine D1 qui serait impliquée dans la dimérisation (Casasnovas *et al.*, 1998). Malgré l'homocomplexation des domaines D1, les épitopes de liaison de ICAM-1 envers LFA-1, ainsi que ceux impliqués dans l'ancrage des rhinovirus ne sont

pas camouflés. Ainsi, la dimérisation de ICAM-1 n'interfère pas au niveau de sa capacité de liaison envers LFA-1 et les rhinovirus. Fait intéressant, les dimères ICAM-1 présentent même une très grande affinité envers les molécules LFA-1 ($K_d = 8\text{nM}$) alors que les formes monomériques sont incapables de se lier à LFA-1 (Miller *et al.*, 1995). Dans le cas des rhinovirus, la dimérisation de ICAM-1 augmente également son affinité (Martin *et al.*, 1993; Casasnovas et Springer, 1995).

1.1.4 Association avec le cytosquelette

Les molécules ICAM-1 peuvent être redistribuées puis concentrées au niveau de la zone de contact cellule-cellule ou cellule-matrice (Dougherty *et al.*, 1988, Carpén *et al.*, 1992, Dustin *et al.*, 1992, Vignola *et al.*, 1994). Les molécules ICAM-1 sont alors principalement localisées sur les microvillosités cellulaires. Ces projections cytoplasmiques, appelées uropodes, sont principalement formées de filaments d'actine qui sont ancrés à la membrane cytoplasmique par l'intermédiaire de protéines d'ancrages, telle que l' α -actinine. Or, il a été montré que la partie intracytoplasmique de ICAM-1 pouvait se lier à l' α -actinine (Carpén *et al.*, 1992). L'étroite collaboration de ICAM-1 avec cet élément du cytosquelette expliquerait sa capacité à pouvoir focaliser son expression membranaire à des endroits stratégiques permettant alors d'optimiser et de stabiliser les interactions cellulaires. Ce processus d'expression polarisée de ICAM-1, qui peut être induit par certaines chimiokines (e.g. RANTES) lors d'interactions leucocyte-cellule endothéliale, a été proposé comme mécanisme facilitant le recrutement des leucocytes de la circulation sanguine (del Pozo *et al.*, 1995 et 1997).

1.1.5 Ligands

1.1.5.1 Ligands endogènes

ICAM-1 possède de nombreux ligands endogènes. Parmi ceux-ci, il y a les intégrines- β_2 , c'est-à-dire, LFA-1 (CD11a/CD18), qui fut le premier ligand de ICAM-1 identifié, ainsi que Mac-1 (CD11b/CD18; CR3) et p150,95 (CD11c/CD18; CR4) (Marlin et Springer, 1987; Diamond *et al.*, 1990, 1991 et 1993). L'utilisation d'AcM de diverses spécificités envers les différents domaines extracellulaires de ICAM-1 et l'utilisation de cellules transfectées avec différentes formes mutantes de ICAM-1 (mutations ponctuelles ou délétion complète de certains domaines d'Ig) ont permis de localiser les différents épitopes de liaison de ICAM-1 envers la plupart de ses ligands. Le domaine N-terminal (D1) est reconnue comme étant la région possédant l'épitope de liaison envers LFA-1

(Staunton *et al.*, 1990) tandis que le site de liaison envers Mac-1 se situe au niveau du domaine D3 (Diamond *et al.*, 1991). De plus, et fait intéressant, la glycosylation de D3 régule l'affinité de ICAM-1 envers Mac-1. Ce phénomène a pu être démontré avec diverses formes purifiées de ICAM-1 qui présentaient différents patrons de glycosylation à leur surface; les formes hypoglycosylées se liant plus fortement à Mac-1. De même, les mutations ponctuelles empêchant la glycosylation du domaine D3 augmente l'affinité de ICAM-1 envers Mac-1 (Diamond *et al.*, 1991). Ces résultats démontrent que la glycosylation différentielle de ICAM-1 joue un rôle important au niveau de son affinité envers Mac-1.

En plus de promouvoir l'adhésion intercellulaire, ICAM-1 sert également de récepteur pour le fibrinogène soluble et l'hyaluronate (Languino *et al.*, 1993; McCourt *et al.*, 1994). L'interaction de ICAM-1 avec le fibrinogène se fait via un épitope de liaison situé au niveau du domaine D1 (Languino *et al.*, 1993; Altieri *et al.*, 1995; D'Souza *et al.*, 1996; Duperray *et al.*, 1997) mais distinct de celui reconnu par LFA-1 puisque certains AcM dirigés contre le domaine D1 inhibent l'interaction du fibrinogène sans affecter la liaison de LFA-1 (Languino *et al.*, 1995).

1.1.5.2 Ligands exogènes

ICAM-1 humain a également été rapporté comme étant le récepteur cellulaire du groupe majeur des rhinovirus et du virus coxsackie A13 (Greve *et al.*, 1989; Staunton *et al.*, 1989). Le domaine de liaison chevauche partiellement celui de LFA-1 (Staunton *et al.*, 1990; McClelland *et al.*, 1991). Des études moléculaires sur l'interaction ICAM-1/rhinovirus ont révélé que les deux premiers domaines de ICAM-1 (D1-D2) se liaient à proximité ou à l'intérieur d'une dépression (appelée « canyon ») de la capsid virale (McClelland *et al.*, 1991).

Un épitope additionnel, également situé sur le domaine D1 de ICAM-1 et distinct de celui de LFA-1, est responsable de la liaison d'érythrocytes qui ont été préalablement infectés par *Plasmodium falciparum*, un des agents étiologiques de la malaria (Berendt *et al.*, 1989 et 1992; Ockenhouse *et al.*, 1992).

1.1.6 Isoformes

Des travaux récents ont identifié six isoformes murines de ICAM-1 résultant de l'épissage alternatif du transcrite primaire de l'ARNm de ICAM-1; ces isoformes sont exprimées de

façon distincte dans les différents tissus de la souris (King *et al.*, 1995). Chez l'humain, un tel phénomène d'épissage alternatif générant différentes isoformes membranaires de ICAM-1 n'a présentement pas été rapporté. Cependant, un phénomène d'épissage alternatif pourrait tout de même se produire chez l'homme puisqu'un ARNm codant pour une forme soluble de ICAM-1 (sICAM-1) a été rapporté chez l'humain par Wakatsuki *et al.* (1995).

1.1.7 Formes solubles

La présence de formes circulantes ou solubles de ICAM-1 (cICAM-1, sICAM-1) a été rapportée dans divers liquides biologiques tels le plasma sanguin, le liquide céphalorachidien, et les sécrétions bronchoalvéolaires (Gearing et Newman, 1993). De nombreux types cellulaires tels les cellules endothéliales, les cellules mononucléées du sang, les kératinocytes et des lignées cellulaires métastatiques se sont avérés des sources importantes de sICAM-1 (van de Stolpe et van der Saag, 1996). Des études ont montré que sICAM-1 possédait une masse moléculaire similaire à celle de la forme recombinante de ICAM-1 (comprenant uniquement la partie extracellulaire) ainsi que légèrement inférieure à celle retrouvée pour la forme transmembranaire, suggérant alors la présence de la quasi-totalité des domaines extracellulaires de ICAM-1 (Seth *et al.*, 1991). Une autre étude a ensuite démontré que sICAM-1 pouvait contenir tous les domaines extracellulaires de ICAM-1 (D1-D5) puisque des anticorps dirigés contre les cinq domaines extracellulaires de ICAM-1 ont tous réagi envers sICAM-1 (Rothlein *et al.*, 1991). Des formes circulantes de masses moléculaires élevées (240, 430, et >500 kDa) ont également été détectées dans le plasma sanguin, en condition électrophorétique non-dénaturante, se qui indiquerait une homocomplexation des molécules sICAM-1 entre elles, ou encore, une hétérocomplexation de sICAM-1 avec d'autres types de molécule (Seth *et al.*, 1991).

La fonction de sICAM-1 a été étudiée en purifiant la forme transmembranaire de ICAM-1 ou à l'aide de formes recombinantes comprenant uniquement la partie extracellulaire (D1-D5). La bioactivité de sICAM-1 est en partie discutable puisqu'elle semble seulement avoir la capacité de se lier à LFA-1 que lorsque sICAM-1 est préalablement adsorbée sur un substrat quelconque (e.g. sphères de polyéthylènes) (Martin *et al.*, 1993, Cobb *et al.*, 1992, Welder *et al.*, 1993). Par ailleurs, d'autres études ont montré que sICAM-1 (non-adsorbée) conservait sa bioactivité en solution puisqu'elle avait la capacité d'inhiber les infections cellulaires causées par le groupe majeur des rhinovirus (HRV54) et le virus coxsackie A13 (Marlin *et al.*, 1990). De plus, des fragments monomériques de sICAM-1

qui contenaient uniquement les deux premiers domaines N-terminal de ICAM-1 (D1-D2) peuvent encore se lier aux érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum*. (Martin *et al.*, 1993). Cette controverse au niveau de la bioactivité de sICAM-1 pourraient s'expliquer du fait que la liaison de sICAM-1 avec LFA-1 nécessiterait une homocomplexation des molécules sICAM-1 entre elles, tel que précédemment rapporté par Miller *et al.* (1995); les formes dimériques sembleraient, en effet, être les seules à avoir la capacité de se lier avec LFA-1.

L'origine de sICAM-1 n'est présentement pas connue. Il apparaît plausible que sICAM-1 résulterait d'un clivage protéolytique de la forme transmembranaire étant donné que des inhibiteurs de protéases inhibent la production de sICAM-1 par certains types cellulaires (Budnik *et al.*, 1996; Lyons et Benveniste, 1998). Les protéases directement impliquées au niveau de la protéolyse de ICAM-1 n'ont cependant pas été identifiées. La forme soluble pourrait également résulter d'un phénomène d'épissage alternatif du transcrite primaire de l'ARNm de ICAM-1 puisqu'un ARNm codant une molécule ICAM-1 sans domaine cytoplasmique, ni domaine transmembranaire, a été identifié chez l'humain (Wakatsuki *et al.*, 1995). À la lumière de ces résultats, la présence de sICAM-1 pourrait donc résulter à la fois d'un phénomène d'épissage alternatif et/ou d'un phénomène de protéolyse membranaire.

Bien que la signification biologique de sICAM-1 demeure inconnue, les niveaux sanguins de sICAM-1 augmentent considérablement dans de nombreux désordres inflammatoires. Des concentrations élevées de sICAM-1 dépassant de plusieurs fois les niveaux sanguins normaux (~200 ng par mL) ont par exemple été rapportées chez des individus présentant diverses infections virales (VIH, hépatite B ou C), divers types de cancers (lymphomes non-Hodgkinien, mélanomes, sein, reins), maladies auto-immunitaires (arthrite rhumatoïde) ou rejets d'organes transplantés (Gearing et Newman, 1993). Il a alors été proposé que les concentrations élevées de sICAM-1 refléteraient une intense activité inflammatoire et que la quantification de sICAM-1 pourrait par conséquent être un outil intéressant pour le diagnostic et le suivi de certains désordres inflammatoires et immunitaires.

1.2 Expression cellulaire et distribution tissulaire

Des études immunohistochimiques sur différents organes humains normaux ont révélé la présence de ICAM-1 au niveau du thymus, des ganglions lymphatiques, des intestins, des reins, du foie et de la peau; la molécule était alors exprimée sur les cellules endothéliales

et épithéliales, les macrophages, les fibroblastes, et les cellules dendritiques de ces différents organes (Dustin *et al.*, 1986). ICAM-1 est également exprimée durant l'hématopoïèse, c'est-à-dire plus spécifiquement par les cellules souches de la moelle osseuse, les cellules de lignées lymphoïdes, ainsi que par les cellules de lignées myéloïdes jusqu'au stade myélocyte et érythroblastocyte (Liesveld *et al.*, 1994). De plus, son expression est maintenue dans les lignées monocytaires (Boyd *et al.*, 1989; Dustin *et al.*, 1986). L'expression de ICAM-1 peut également être induite sur d'autres types cellulaires tels que la plupart des cellules immunitaires qui n'expriment la molécule de façon constitutive. Plusieurs agents ont été rapportés comme étant capables d'induire ou de réduire l'expression de ICAM-1 (voir revue de van de Stolpe *et al.*, 1996); des cytokines pro-inflammatoires comme l'IFN- γ , l'IL-1 et le TNF- α ont été rapportées comme étant d'importants inducteurs d'expression de ICAM-1 (Dustin *et al.*, 1986); par ailleurs, les glycocorticoïdes ont été décrits comme étant des inhibiteurs d'expression de ICAM-1 (Stolpe *et al.*, 1994).

1.3 Rôle biologique

ICAM-1 joue un rôle déterminant dans plusieurs processus physiologiques tels que le développement de la réponse immunitaire et inflammatoire. L'utilisation d'AcM, d'antisens dirigés contre les ARNm de ICAM-1, et le développement, par génie génétique, de souris ICAM-1-déficientes ont grandement contribué à l'élucidation et à la compréhension des principales fonctions biologiques de ICAM-1. Ainsi, la fonction majeure de ICAM-1 apparaît clairement comme étant de consolider les interactions intercellulaires qui surviennent durant l'extravasation des leucocytes (voir section « 1.3.1 Interaction leucocyte/cellule endothéliale ») ainsi que durant l'activation des lymphocytes T (voir section « 1.3.2 Activation des lymphocytes T »).

En plus de remplir une fonction d'adhésion, ICAM-1 jouerait également un rôle en tant que molécules de transduction de signaux intracellulaires et ce, malgré sa courte queue cytoplasmique. De nombreux travaux ont en effet fait état de la capacité de ICAM-1 à émettre des signaux intracellulaires (« outside-in signaling ») suite à son « cross-linking » à l'aide d'AcM. Cette fonction pourrait mener, entre autre, à l'inhibition de la sécrétion de cytokines (e.g., IFN- γ , TNF α , et IL-1) par les lymphocytes activés (Geissler *et al.*, 1990) ainsi qu'à l'induction de la flambée oxydatives par les monocytes (Rothlein *et al.*, 1993). Dans le cas des cellules endothéliales du cerveau, le cross-linking de ICAM-1 induirait l'activation de la kinase pp60^{src} qui à son tour, induirait la phosphorylation de la

cortactin, une protéine du cytosquelette (Durieu-Trautmann *et al.*, 1994). Dans d'autres cas bien précis, le co-cross-linking de ICAM-1 et des IgM membranaire sur des cellules de lymphomes de Burkitt interférerait avec la mobilisation du calcium, induit par le cross-linking des IgM seul (Horssen *et al.*, 1995). Par ailleurs, et toujours sur des cellules de lymphome B, Holland et Owens (1997) ont montré que le cross-linking de ICAM-1 i) augmentait l'expression du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II), ii) induisait la phosphorylation de tyrosines sur plusieurs protéines incluant la famille de kinase p53/p56 (lyn), et iii) induisait l'activation des kinases Raf-1 et MAP kinase (« mitogen-activated protein kinase »).

1.3.1 Interaction leucocyte/cellule endothéliale

Lors des processus inflammatoires locaux, des interactions transitoires de faibles affinités entre les leucocytes et l'endothélium vasculaire activé sont initialement observées; ces interactions, qui sont principalement établies par des sélectines, permettent de ralentir la course hydrodynamique des leucocytes au niveau de la paroi vasculaire (phénomène de « rolling »). Des cytokines exprimées à la surface des cellules endothéliales activées viennent ensuite activer (mécanisme « outside-in ») les intégrines $\beta 2$ des leucocytes (LFA-1 et Mac-1), ce qui a pour effet d'augmenter leur affinité envers leur ligands respectifs. Les interactions LFA-1/ICAM-1 ont été démontrées comme jouant un rôle clé durant l'extravasation des lymphocytes à travers la paroi de l'endothélium vasculaire; ces interactions transitoires permettent aux lymphocytes d'adhérer fermement contre les cellules endothéliales activées qui surexpriment ICAM-1 (Butcher, 1991, Dustin *et al.*, 1992, Beekhuizen *et al.*, 1992, Dustin *et al.*, 1988). Dans le cas des neutrophiles et des monocytes/macrophages, l'adhésion ferme à l'endothélium est médié par des interactions Mac-1/ICAM-1 dépendantes (Lo *et al.*, 1989; Diamond *et al.*, 1990). Fait intéressant, des travaux récents publiés par Cai et Wright (1996) apportent des indications que la protéase HLE pourrait être nécessaire pour le détachement des PMN contre l'endothélium vasculaire. Ce groupe a en effet montré que HLE était un ligand abondant pour Mac-1. De plus, un AcM contre HLE a prévenu i) le détachement des PMN contre une surface adsorbée de fibrinogène et ii) leur chimiotactisme, confirmant alors un rôle important pour HLE. Ces auteurs ont alors proposé un modèle dans lequel les interactions Mac-1 dépendantes seraient régulées par des protéases telles HLE; un mécanisme de déadhesion des PMN qui faciliterait leur infiltration à travers l'endothélium vasculaire.

D'autres facteurs participeraient également à l'extravasation des leucocytes. C'est le cas notamment du fibrinogène soluble du plasma sanguin. En effet, sa co-liaison avec ICAM-1 et d'autres molécules de surface (e.g. LFA-1 ou Mac-1) faciliterait le recrutement et l'adhésion des leucocytes en agissant comme pont intermoléculaire (Languino *et al.*, 1993, Sriramarao *et al.*, 1996).

Le rôle important que joue ICAM-1 durant l'extravasation de leucocytes se manifeste chez des souris ICAM-1-déficientes puisqu'on y trouve des niveaux sanguins anormalement élevés de neutrophiles et de lymphocytes et une réduction significative de l'activation et de la migration des leucocytes aux sites inflammés (Xu *et al.*, 1994, Sligh *et al.*, 1993). Fait intéressant, la diminution de l'expression de ICAM-1 semble protéger ces souris contre le choc septicémique induit par l'injection de LPS ou du SEB en réduisant la réponse inflammatoire (Xu *et al.*, 1994). Ces observations suggèrent une fonction immunologique importante pour ICAM-1 au niveau des processus inflammatoires locaux ainsi qu'un rôle pathophysiologique majeur durant le choc septicémique.

1.3.2 Activation des lymphocytes T

Durant la génération d'une réponse inflammatoire impliquant les lymphocytes T, les interactions ICAM-1/LFA-1 ont également été démontrées comme jouant un rôle déterminant (Springer, 1990). Au niveau du système immunitaire, ICAM-1 est exprimée sur les monocytes/macrophages (Dustin *et al.*, 1986, Dougherty *et al.*, 1988, Möst *et al.*, 1992a et 1992b), les lymphocytes B et les plasmocytes (Clark *et al.*, 1986, Arkin *et al.*, 1991) ainsi que sur les lymphocytes T activés et mémoire (Dustin *et al.*, 1986, Dougherty *et al.*, 1988, Boyd *et al.*, 1989, Buckle *et al.*, 1990). Les cellules présentatrices d'Ag, comme les macrophages et les lymphocytes B, co-expriment ICAM-1 en association avec le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) pour activer les cellules CD4+ auxiliaire (Fischer *et al.*, 1992, Damle *et al.*, 1992). La présence de ICAM-1 durant la présentation d'Ag est importante puisque la cotransfection de ICAM-1 et de HLA-DR a permis de reconstituer et d'augmenter le processus de présentation d'Ag sur des cellules initialement non-permissives au phénomène (Fischer *et al.*, 1992, Altmann *et al.*, 1989). Dans la réponse T à médiation cellulaire cytotoxique, ICAM-1 participe également à l'activation des cellules T cytotoxiques non-CMH dépendantes (Maio *et al.*, 1989, Makgoba *et al.*, 1988) ainsi que durant l'activation des cellules CD8+ cytotoxiques CMH-I dépendantes (Vanky *et al.*, 1990, Jansen *et al.*, 1992, Ybarrondo *et al.*, 1994).

2.0 ÉLASTASE DE LEUCOCYTES

L'élastase de leucocyte humaine est une sérine protéase qui possède une fonction catalytique optimale à pH neutre. HLE a reçu une attention bien particulière depuis ces deux dernières décennies puisque de nombreuses évidences cliniques et expérimentales ont suggéré qu'elle était l'un des principaux médiateurs responsables de la destruction tissulaire qui est observée dans certaines maladies inflammatoires telles la fibrose kystique (FK), l'emphysème pulmonaire et l'arthrite rhumatoïde. Le caractère épidémiologique important de ces trois pathologies a donc suscité un intérêt scientifique marqué et soutenu à l'étude des principaux médiateurs cellulaires responsables de la sécrétion de HLE ainsi qu'à l'identification des principaux régulateurs de son activité catalytique. De nombreux efforts ont également été entrepris à l'élaboration d'inhibiteurs de HLE non-toxiques comme agents thérapeutiques. Voici donc une revue des principales propriétés physico-chimiques de HLE, des régulateurs de son activité catalytiques, ainsi que son implication dans les processus pathophysiologiques chez l'humain.

2.1 Structure

HLE est une glycoprotéine constituée d'une simple chaîne polypeptidique de 218 a.a. dont la structure tertiaire est stabilisée par quatre ponts disulfures (Sinha *et al.*, 1987; Travis, 1988; Takahashi *et al.*, 1988; Jenne, 1994). Une triade catalytique (Asp, His, Ser), commune aux sérines protéases, est responsable de sa fonction enzymatique. L'hétérogénéité du masse moléculaire de HLE (25-30 kDa) est vraisemblablement due à une glycosylation différentielle de la protéine qui est effectuée sur deux résidus asparagine (Asn-95 et Asn-144) (Sinha, 1987). De nombreux résidus basiques confèrent également à HLE une importante charge nette positive lui conférant un point isoélectrique élevé (pI = 11.0) (Remold-O'Donnel et Parent, 1995).

La structure tridimensionnelle de HLE complexé avec l'inhibiteur peptidique MSAAPVCK a été déterminée par cristallographie à une résolution de 1.84-Å (Navia *et al.*, 1989) (**Fig. 2**); celle de la forme native (i.e. non-complexée) n'a cependant pu être déterminée puisque des cristaux constitués de HLE seule se sont avérés inappropriés pour des études cristallographiques de hautes résolutions (Williams *et al.*, 1987). Les données obtenues sur sa structure tridimensionnelle ont révélé que: i) HLE possédait une structure globulaire compacte, ii) deux sites de glycosylations étaient présents à sa surface, et iii) la plupart des nombreux résidus arginines (chargées positivement) étaient distribués de

façon asymétrique au niveau de sa surface externe. Bien que le rôle de ces résidus basiques ne soit présentement pas connu, certains auteurs ont suggéré qu'ils étaient probablement impliqués au niveau de l'entreposage de HLE dans les granules azurophiliques des PMN: des interactions ioniques entre ces résidus basiques et certains composants acides (polysaccharides) de la matrice interne des granules permettraient de garder HLE sous une forme essentiellement insoluble (Travis, 1988).

Figure 2: Structure tridimensionnelle de HLE.



2.2 CELLULES PRODUCTRICES DE HLE

Les neutrophiles sont les principaux sécréteurs de HLE. Ceux-ci entreposent majoritairement HLE dans leurs granules azurophiliques (primaires). Les PMN ne peuvent renouveler leur stock de HLE puisque la capacité de synthétiser HLE est perdue durant le processus de maturation/différentiation des myélocytes en PMN (Fouret *et al.*, 1989). Les granules azurophiliques qui contiennent principalement HLE entreposent également d'autres sérines protéases homologues à HLE telles que la cathepsine G et la protéinase 3. Chaque unité granulaire contient approximativement 67,000 molécules de HLE (Liou et Campbell, 1995), alors que des études effectuées par microscopie électronique ont montré la présence de plus de 400 granules azurophiliques dans le cytoplasme des PMN (Liou et Campbell, 1995). Ainsi, la dégranulation des PMN (phénomène d'exocytose granulaire) entraîne une libération massive de HLE au niveau extracellulaire. La protéase se présente alors sous une forme libre ou encore associée de façon non-covalente à la membrane cytoplasmique des PMN (voir section « Formes membranaires de HLE » pour plus de détails).

Bien que les PMN soient les principaux sécréteurs de HLE, les monocytes entreposent et sécrètent également des quantités appréciables de HLE (Campbell *et al.*, 1989). Les lymphocytes T (CD4 et CD8 positifs) et B ainsi que les cellules NK expriment également HLE (Bristow *et al.*, 1991), tout comme les éosinophiles et les mastocytes/basophiles (Lungarella *et al.*, 1992; Meier *et al.*, 1989). La protéase HLE est donc exprimée de façon ubiquitaire par les leucocytes, et c'est pourquoi on lui attribue maintenant le nom d'élastase de leukocyte (HLE) plutôt qu'anciennement celui d'élastase de neutrophile (NE).

2.3 Substrats

HLE possède une activité catalytique optimale à pH neutre (Ohlsson *et al.*, 1974) et possède un large spectre de spécificité envers de nombreuses glycoprotéines de la matrice extracellulaire telles l'élastine pulmonaire (Travis, 1988), la fibronectine (McDonald *et al.*, 1980), des protéoglycans du cartilage osseux (Janoff *et al.*, 1976) et du collagène de type I et III (Kafienah *et al.*, 1998; Gadek *et al.*, 1980, Mainardi *et al.*, 1980). Des facteurs solubles ont également été décrits comme étant protéolysés par HLE. C'est le cas notamment des IgG (Solomon *et al.*, 1978), de C3 (Taylor *et al.*, 1977), de l'IL-8 (Leavell *et al.*, 1997) et de certains facteurs de coagulation comme le plasminogène (Moroz *et al.*, 1981) et le fibrinogène (Plow, 1980). Par ailleurs, la protéolyse par HLE de plusieurs

antigènes à la surface membranaire a récemment été décrite par de nombreux auteurs, notamment pour CD4 et CD8 (Döring *et al.*, 1995), CD16 (Tosi et Berger, 1988), CD43 et PSGL-1 (Remold-O'Donnell et Parent, 1995), le récepteur de thrombine (Renesto *et al.*, 1997), et le récepteur plaquettaire du fibrinogène, i.e. l'intégrine $\alpha\text{IIb}\beta_3$ (Si-Tahar *et al.*, 1997).

2.4 Régulation de l'activité enzymatique de HLE

La puissante activité catalytique de HLE est régulée par de nombreux inhibiteurs de protéases qui sont pour la plupart retrouvés en importantes quantités dans le plasma sanguin. Parmi ceux-ci, l' α 1-antitrypsine (α 1-AT) et l' α 2-macroglobuline (α 2-MG) ont été rapportés comme étant les deux principaux inhibiteurs plasmatique de HLE (voir revue par Roberts *et al.*, 1995). L' α 1-AT (52 kDa) est un membre des SERPINs (« Serine protease inhibitors ») qui possède une très grande affinité envers HLE. Son association directe avec le site catalytique de HLE entraîne la formation de complexe stable et permanent puisque deux liens covalents sont établis entre HLE et α 1-AT (Travis, 1988; Roberts *et al.*, 1995). L' α 2-MG est pour sa part un inhibiteur protéolytique non-usuel. Celui-ci est en effet un tétramère de haut masse moléculaire (720 kDa) composé de quatre sous-unités identiques qui ne contrôle pas HLE en se liant directement à son site catalytique, mais emprisonne plutôt HLE, ce qui inhibe l'accès des substrats par encombrement stérique (Roberts *et al.*, 1995).

D'autres inhibiteurs naturels de HLE ont également été rapporté dans la littérature. Un inhibiteur de faible masse moléculaire (11,7 kDa) connu sous le nom de SLPI (« secretory leukocyte protease inhibitor ») qui avait initialement été rapporté dans les sécrétions de glandes parotides humaines et qui a ensuite été détecté dans les tissus cartilagineux, les voies pulmonaires supérieures, ainsi que dans le cytosol des neutrophiles (Thompson et Ohlsson, 1986; Ohlsson *et al.*, 1997; Sallenave *et al.*, 1997). Un autre inhibiteur, également de très faible masse moléculaire (7,0 kDa), a été isolé à partir des éruptions cutanées de patients atteints de psoriasis (Wiedow *et al.*, 1990). Celui-ci, contrairement aux autres (e.g. α 1-AT, α 2-MG et SLPI), a la particularité d'être très spécifique à HLE puisqu'il s'est avéré inefficace dans l'inhibition d'autres sérines protéases, telles que la cathepsine G, la trypsine, l' α -chymotrypsine, et la plasmine. L'inhibiteur a alors été baptisé Elafin étant donné sa spécificité envers l'élastase de leucocyte.

2.5 Formes membranaires de HLE

Des formes membranaires de HLE ont été mises en évidence à la surface des leucocytes à l'aide d'AcM contre HLE (Owen *et al.*, 1995). Ces formes sont dues à la présence de récepteurs HLE puisque l'ajout de HLE exogène dans le milieu extracellulaire entraîne une association non-covalente de HLE au niveau de la membrane des leucocytes. Parmi ces récepteurs, l'intégrine $\beta 2$ Mac-1 a été rapporté comme étant l'un des récepteurs présents à la surface des PMN capable de lier HLE ainsi que plusieurs autres sérines protéases (Cai et Wright, 1996). Les auteurs de cette étude n'ont cependant pu déterminer si l'activité catalytique de HLE était préservée suite à son association physique avec Mac-1, mais tout laisse à croire qu'elle pourrait l'être puisque l'activité protéolytique du Facteur X (également une sérine protéase) est préservée suite à son association avec Mac-1 (Altieri et Edgington, 1988). Une autre équipe a rapporté que le TCR avait également la capacité de lier HLE puisqu'un AcM contre HLE a révélé, suite à une immunoprécipitation du TCR, l'association physique de HLE avec le TCR (Bristow et Flood, 1993). D'autres travaux publiés par Owen *et al.* (1995) ont montré que l'activité catalytique de HLE membranaire était préservée à la surface des PMN et ce, même envers des substrats de hauts masse moléculaires comme la fibronectine. Fait intéressant, les formes associées à la membrane cytoplasmique sont résistantes aux inhibiteurs naturels de protéases de hauts masse moléculaires (e.g. $\alpha 1$ -AT). Les inhibiteurs synthétiques de faibles masse moléculaires (e.g. MSAAPVCK et PMSF) ont, par ailleurs, la capacité d'inhiber les formes membranaires, alors que les inhibiteurs naturels de masse intermédiaires (e.g. SLPI) montrent une efficacité moyenne. Étant donné que l'efficacité de ces inhibiteurs envers les formes membranaires de HLE est inversement proportionnelle à l'importance de leur masse moléculaire, il a donc été proposé qu'un phénomène d'encombrement stérique serait le principal mécanisme par lequel les formes membranaires de HLE pourraient échapper à l'action des inhibiteurs naturels de protéases (Owen *et al.*, 1995). L'association membranaire de HLE et sa longue demi-vie catalytique envers ses principaux inhibiteurs naturels représentent deux niveaux de régulation par lequel les leucocytes contrôleraient l'activité protéolytique de HLE.

2.6 Pathophysiologie

HLE a été associée dans la pathogenèse de plusieurs maladies inflammatoires, incluant l'emphysème pulmonaire, l'arthrite rhumatoïde, le syndrome de détresse respiratoire chez l'adulte, et la fibrose kystique (Travis, 1988; Döring, 1994; Roberts *et al.*, 1995). Sa puissante activité catalytique et son large spectre de spécificité envers de nombreuses

protéines de la matrice extracellulaire, telles l'élastine pulmonaire et la fibronectine, expliquerait les dommages tissulaires qui sont observés au niveau pulmonaire dans la FK et l'emphysème pulmonaire. L'observation qu'une déficience génétique en $\alpha 1$ -AT (le principal inhibiteur de HLE) était associée au développement d'emphysème suggère que HLE jouait un rôle crucial dans la pathogenèse de cette maladie (Döring, 1994). Ce concept est également supporté par des études démontrant le développement d'emphysème lorsque HLE est vaporisée dans les poumons d'animaux sains (Döring, 1994). L'ensemble de ces études ont mené au concept que l'emphysème résulterait d'un déséquilibre du ratio enzyme:inhibiteur, en faveur des protéases (principalement HLE). Dans la FK, par exemple, d'importantes concentrations de HLE active ont été retrouvées dans les liquides bronchoalvéolaires: McElvaney *et al.* (1991) ont rapporté des concentrations de HLE dépassant les 200 μg par mL en moyenne chez 12 patients atteints de FK; Goldstein et Döring (1986) ont, quant à eux, rapporté des concentrations moyennes de 96 μg par mL chez 15 de ces patients. La destruction de l'élastine pulmonaire, constituant important des alvéoles pulmonaires, entraîne alors de sérieux troubles respiratoires, parfois même de l'insuffisance respiratoire (Greenberger, 1997). Les concentrations élevées de HLE réduiraient également le battement des cils pulmonaires, entraînant une accumulation du mucus (Stockley, 1994) qui obstrue les voies respiratoires et favorise, par conséquent, le développement d'infections bactériennes (e.g. par *Pseudomonas aeruginosa* dans la majorité des cas). Les individus atteints de FK n'ont donc d'autre choix que de recourir à l'antibiothérapie étant donné l'inefficacité de leur réponse immunitaire locale à répondre adéquatement à de telles infections. Cet état d'immunodéficience local semble être dû au fait que les concentrations élevées de HLE modulent la réponse immunitaire en induisant, entre autre, le clivage des Ig et du récepteur C3b, ce qui réduit considérablement l'efficacité du processus d'opsonophagocytose des bactéries par les neutrophiles et macrophages alvéolaires (Döring, 1994).

Les raisons expliquant cette libération non contrôlée de HLE par les neutrophiles sont encore peu connues. Dans l'emphysème pulmonaire de type familial, différents types de mutations ont été rapportées au niveau du gène de $\alpha 1$ -AT pouvant expliquer ce déséquilibre enzyme:inhibiteur (Greenberger, 1997). La mutation z qui est la plus fréquente des mutations inhibe la production (i.e. sécrétion) de $\alpha 1$ -AT par les cellules du foie expliquant alors pourquoi les individus homozygotes z/z montrent une susceptibilité accrue à développer l'emphysème pulmonaire par rapport aux individus normaux qui présentent des taux plasmatiques élevés de $\alpha 1$ -AT (Greenberger, 1997). Par ailleurs,

lorsque les concentrations molaires de HLE deviennent équivalentes ou supérieures à celles de α 1-AT, HLE a alors la capacité d'inhiber l'activité inhibitrice de α 1-AT par protéolyse partielle (Travis, 1988, Roberts, 1995). L'inactivation de α 1-AT par HLE peut donc expliquer, en partie, pourquoi l' α 1-AT n'arrive pas à contrebalancer l'activité catalytique de HLE dans la FK puisque les concentrations molaires de HLE deviendraient supérieures à celles de α 1-AT dans les sécrétions bronchoalvéolaires.

HYPOTHÈSE DE TRAVAIL ET OBJECTIFS GÉNÉRAUX

Hypothèse de travail

La sérine protéase HLE pourrait être impliquées au niveau de la régulation de l'expression cellulaire de ICAM-1 selon un mécanisme de protéolyse membranaire.

Objectifs

1. Évaluer la capacité de HLE à effectuer la protéolyse membranaire de ICAM-1 sur différentes lignées cellulaires humaines.
2. Étudier différents aspects biochimiques du clivage protéolytique de ICAM-1 tels la masse moléculaires des fragments générés, l'identification du ou des sites de clivage préférentiel, et l'effet de la glycosylation de ICAM-1.
3. Évaluer la capacité de HLE à effectuer la protéolyse de ICAM-1 *in vivo*, dans un contexte pathophysiologique, tel que la fibrose kystique.

APPROCHE EXPÉRIMENTALE

1.1 PROTÉASES ET INHIBITEURS DE PROTÉASES

1.1.1 Élastase de leucocyte (HLE)

HLE (E.C. 3.4.21.11), purifiée à partir de neutrophiles sanguins de donneurs sains, a été obtenue sous forme lyophilisée de Calbiochem (La Jolla, CA). Sa pureté a été évaluée par le fabricant à plus de 99% par SDS-PAGE. Les différents lots de HLE reçus durant cette étude ont été dissous et aliquotés dans du RPMI complet sans sérum à une concentration de 200 µg par mL, puis conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

1.1.2 Gélatinase B (MMP-9)

MMP-9 (Gélatinase B; E.C. 3.4.24.35) humain a été purifié par chromatographie d'affinité sur colonne de Sepharose-Gelatin (Pharmacia) à partir de surnageants de cellules monocytaires THP-1 stimulées au PMA et son activité enzymatique a été déterminée par cytométrie en flux, selon la technique précédemment décrite par St-Pierre *et al.* (1996), en mesurant le taux de digestion de gélatines fluorescentes adsorbées sur des microsphères de polyéthylène (voir ci-après). Une solution stock de MMP-9 (274 µg/mL de PBS) a été conservée à -20°C jusqu'à son utilisation.

1.1.3 Trypsine et chymotrypsine bovines

La trypsine et la chymotrypsine bovines ont été obtenues de la compagnie Sigma (St. Louis, MO). Des solutions de 1 mg par mL de PBS ont été conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation.

1.1.4 α 1-antitrypsine (α 1-AT) et MSAAPVCK

L' α 1-AT humain a été obtenu sous forme lyophilisée de la compagnie Calbiochem et a été dissout dans du PBS à une concentration de 1 mg par mL. L'inhibiteur peptidique MSAAPVCK a été obtenu de Sigma et a été dissout dans du DMSO à une concentration de 10 mM. Des dilutions en séries (i.e. 1:10) ont ensuite été effectuées dans du PBS. L' α 1-AT ainsi que les différentes solutions de MSAAPVCK ont été conservés à -20°C jusqu'à leur utilisation.

1.1.5 Échantillons de lavages bronchoalvéolaires (BAL) de patients atteints de FK

Les échantillons BAL de patients atteints de FK ont été obtenus du Dr André M. Cantin, M.D. (Université de Sherbrooke, QC). Les échantillons qui avaient été dilués dans un volume égal de PBS ont été conservés dans des tubes Eppendorf à -70°C jusqu'à leur utilisation.

1.2 ANTICORPS MONOCLONAUX

Les analyses d'expression de ICAM-1 ont été effectuées à l'aide de deux AcM: i) Un anti-ICAM-1 humain conjugué à la fluorescéine (clone B-H17; IgG1 kappa de souris) de la compagnie Biosource International (Camarillo, CA) dont l'épitope de liaison est inconnu, et ii) un anti-ICAM-1 humain (clone RR1/1; IgG1 kappa de souris) qui a été gracieusement offert par le Dr T. A. Springer (Center for Blood Research, Boston, MA) et qui se lie au niveau du domaine D1 de ICAM-1 (Rothlein *et al.*, 1991). L'expression de CD4 a été mesurée à l'aide de l'anti-CD4 humain MT-310 (IgG1 kappa de souris) conjugué à la phycoérythrine (PE), obtenu de la compagnie DAKO (Carpinteria, CA). L'expression de la chaîne β de HLA-DR a été déterminée à l'aide de l'AcM CR3/43 (IgG1 kappa de souris) de Boehringer Mannheim (Laval, QC). L'anti-Fc (F9006; fraction IgG de chèvre) de souris conjugué avec FITC a été obtenu de Sigma.

1.3 LIGNÉES CELLULAIRES

Différentes lignées cellulaires d'origine humaine ont été utilisées dans ce travail. La lignée promyélocytaire U-937, la lignée monocytaire THP-1, ainsi que la lignée Raji, issue du lymphome B humain, ont été fournies par le Dr Daniel Oth de l'IAF. Les trois lignées de lymphocytes T humains MT-2, MT-4 et C5MJ ont été obtenues du Dr Pierre Talbot de l'IAF.

1.4 CULTURE CELLULAIRE

Les cellules ont été maintenues en culture dans du milieu RPMI-1640 supplémenté de 10% (v/v) de SFV, de 2 mM de glutamine, de 10 mM de tampon HEPES, de 100 U par mL de pénicilline et de 100 μ g par mL de streptomycine. La culture cellulaire a été effectuée dans des flacons à fond plat conçus pour des cellules non-adhérentes et pouvant contenir des volumes de 25 ou de 75 mL (Sarstedt, Newton, NC). Les flacons de culture ont été placés dans un incubateur à 37°C, humidifié à 95% et sous une atmosphère de 5% de CO₂. Les passages cellulaires ont été effectués en moyenne à tous les 4 à 5 jours en fonction de la densité cellulaire et du pH. Pour chaque passage, 1x10⁵ à 1x10⁶ cellules ont été redistribuées dans de nouveaux flacons de culture contenant du milieu frais.

1.5 CLIVAGE DES MOLÉCULES DE SURFACE PAR HLE

Les cellules ont été lavées trois fois par centrifugation (5 min à 1200 rpm; Modèle Centra-7R, Needham Hts., MA) dans 10 mL de milieu RPMI complet sans sérum (RPMI-S⁻) et la concentration cellulaire a été déterminée par microscopie optique à l'aide d'un

hématiémètre. Les cellules ont alors été ajoutées dans des plaques de 96 puits à fond rond. Les puits contenait 80 μL de cellules (2×10^5 cellules) resuspendues dans du RPMI-S⁻ et 10 μL d'une solution stock de HLE (généralement 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Lorsque spécifié, 10 μL de $\alpha 1$ -AT (1 mg/mL) ou 10 μL de différentes solutions de MSAAPVCK ont été ajouté à 10 μL de solution HLE (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$); le tout a été incubé pendant 15 min à 37°C avant l'ajout aux cellules. Le volume a été complété à 100 μL et les cellules ont été incubées dans un incubateur à 37°C, 95% d'humidité et 5% de CO₂ pour les différents temps indiqués. Après incubation, les cellules ont été lavées trois fois par centrifugation (3 min à 1200 rpm) dans 200 μL de PBA [PBS contenant 1% (v/v) d'albumine de sérum bovin et 0,01% (p/v) d'azide de sodium] afin d'analyser l'expression de ICAM-1 (et autres molécules de surface) par cytofluométrie en flux (voir « Analyse de fluorescence par cytofluométrie en flux »).

Dans certaines expériences, les cellules ont été incubées pendant 1,5 h à 37°C avec la neuraminidase de *Vibrio cholerae* (0,2 U/ml; Boehringer Mannheim), ou pendant 30 min à 4°C avec des concentrations saturantes de l'AcM RR1/1, et ont finalement été lavées avant le traitement HLE.

1.6 RÉEXPRESSION DE ICAM-1 SUITE À UN CLIVAGE MEMBRANAIRE

Des cellules U-937 ont été incubée pendant 2 h à 37°C avec ou sans HLE (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La réaction enzymatique a ensuite été arrêtée par trois lavages consécutif dans du RPMI-S⁻. Les cellules (2×10^5) ont finalement été ajoutées dans une plaque de 24 puits contenant 1 mL de RPMI complet additionné de 10% de SFV et incubées dans un incubateur à 37°C, 95% d'humidité et 5% de CO₂. Aux temps indiqués, les cellules ont été analysées pour l'expression de ICAM-1 par cytofluométrie à l'aide d'un AcM anti-ICAM-1.

1.7 ANALYSE DE LA PROTÉOLYSE DE rsICAM-1 PAR HLE

rsICAM-1 (5 μg), gracieusement offert par Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals (Ridgefield, CT), a été incubé avec différentes concentrations de HLE (4-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) dans un volume final de 10 μL de PBS à différents temps à 37°C dans des tubes Eppendorf. Dans certaines expériences, rsICAM-1 (1 μg) a été préincubé pendant 20 h avec la N-glycosidase F de *Flavobacterium meningosepticum* (80 U/mL; Boehringer Mannheim) ou pendant 1 h avec la neuraminidase de *Vibrio cholerae* (0,4 U/mL) dans un volume final de 10 μL à 37 °C dans des tubes Eppendorf de 500 μL scellés avec du parafilm afin de limiter l'évaporation du milieu; à la suite du traitement, les tubes ont été centrifugés (30 sec à 8000 rpm) et 1 μl de HLE (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a été ajouté aux échantillons

et le tout a été réincubé à différents temps. Les échantillons ont ensuite reçu 10 µL de tampon de solubilisation (Solution 2X avec mercaptoéthanol) et le tout a été incubé à 95°C pendant 5 min afin de dénaturer complètement les protéines. Les échantillons ont finalement été analysés par électrophorèse de type SDS-PAGE (Voir plus bas).

1.8 ANALYSE ÉLECTROPHORÉTIQUE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRÉSENCE DE DODÉCYLSULPHATE DE SODIUM (SDS-PAGE)

1.8.1 Préparation des gels

Les gels de polyacrylamide ont été préparés selon le protocole et l'appareil du système « Mini-Protean II » de Bio-Rad (Mississauga, Ont, Canada) (Shapiro *et al.*, 1967). Un gel de séparation de polyacrylamide [10% (p/v) acrylamide; 0,38 M Tris-HCL pH 8,8; 0,1% (p/v) SDS; 0,05% (p/v) persulfate d'ammonium; 0,05% (v/v) TEMED] a été coulé entre deux plaques de verre. Après environ 30-45 min, le gel de séparation étant polymérisé, un gel d'entassement [4% (p/v) acrylamide, 0,125 M Tris-HCL pH 6,8; 0,1% (p/v) SDS; 0,05% (p/v) persulfate d'ammonium; 0,1% (v/v) TEMED] a été coulé par-dessus le gel de séparation, avec un peigne contenant le nombre d'espace approprié au nombre d'échantillons. Les échantillons contenus dans des tubes Eppendorf avec fermoir (« snap-cap ») ont été bouillis (~95°C) pendant 5 minutes puis centrifugés (8000 rpm pendant 30 sec) et mis sur la glace avant d'être chargés sur le gel. La migration a eu lieu pendant environ 45 min à 200 Volt dans le tampon de migration [120 mM Tris; 959 mM glycine; 0,5% (p/v) SDS]. La masse moléculaire apparente des protéines et des fragments protéolytiques a été déterminée à l'aide de standards « Low marker » de BioRad.

1.8.2 Coloration des protéines

1.8.2.1 Bleu de Coomassie

Les gels ont été colorés pendant une heure avec une solution de bleu de Coomassie G-250 (0,1% p/v) contenant 40% (v/v) de méthanol et 10% (v/v) d'acide acétique glacial. Une solution de décoloration [50% (v/v) méthanol, 10% (v/v) acide acétique] a été utilisée afin de permettre la visualisation des protéines.

1.8.2.2 SYPRO-RED

Selon les directives du fabricant, les gels ont été incubés pendant 2 h à la température ambiante, à la noirceur, et sous agitation constante sur plateau rotatif, dans 50 mL de colorant de gel SYPRO-RED [réactif SYPRO-RED dilué dans 70% (v/v) d'éthanol]. Les protéines marquées spécifiquement avec le réactif SYPRO-RED ont ensuite été visualisées sous rayonnement ultraviolet (BioRad, modèle Gel Doc 1000, Mississauga,

Ont, Canada) et une photographie numérique du gel a ensuite été prise puis sauvegardée en un fichier graphique (Format TIFF-8 bits).

1.8.3 Analyse densitométrique

Pour évaluer précisément la densité optique (D.O.) des bandes électrophorétiques, des analyses densitométriques ont été effectuées à l'aide d'un densitomètre de modèle GS-670 (Bio-Rad, Mississauga, Ont, Canada) et du logiciel « Molecular Analyst » (Version 1.3). Dans certaines analyses, des amplifications non-linéaires ont été utilisées pour visualiser clairement les bandes de faible intensité. L'amplification non-linéaire est un outil d'analyse d'image numérique permettant d'augmenter l'intensité des bandes (i.e. « foreground ») en réduisant la co-amplification de l'arrière-plan (i.e. « background »). Il est cependant important de noter que l'aspect semi-quantitatif entre les bandes est perdu à la suite d'une telle amplification.

1.9 CLIVAGE MEMBRANAIRE DE ICAM-1 DANS DES LIQUIDES BAL DE PATIENTS ATTEINTS DE FK

Des cellules U-937 (2×10^5) ont été incubées avec HLE (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou avec des dilutions d'échantillons BAL (1:4 ou 1:40) de patients atteints de FK en présence ou en absence de $\alpha 1$ -AT (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou de MSAAPVCK (10 mM) dans un volume final de 15 μL pendant 2 h à 37°C dans des tubes Eppendorf. Après l'incubation, l'expression cellulaire de ICAM-1 et de CD4 a été analysée par cytofluométrie en flux.

1.10 ANALYSE PAR CYTOFLUOMÉTRIE EN FLUX

Les cellules ont été lavées deux fois par centrifugation (1200 rpm pendant 3 min) dans du PBA froid. Le culot cellulaire a ensuite été resuspendu dans un volume total de 50 μL contenant 45 μL de PBA froid et 5 μL d'une solution saturante d'AcM. Pour le marquage indirect, les cellules ont été lavées deux fois après l'incubation du premier AcM (B-H17, RR1/1, MT-310 ou CR3/43) puis incubées à nouveau dans une solution saturante d'un antisérum (F9006, Sigma) conjugué à la fluorescéine et spécifique pour les IgG murines. Après le marquage, les cellules ont été lavées deux fois dans du PBA puis resuspendues dans 400 μL de PBS additionné de 0,01% (p/v) d'azide de sodium. Les échantillons ont été gardés à 4°C dans la noirceur puis analysés le jour même à l'aide d'un cytofluoromètre de modèle Coulter Epics XL (Coulter Electronics, Hialeah, FL), équipé d'un laser argon refroidit à l'air qui émettait une longueur d'onde de 488nm. Des contrôles d'autofluorescence cellulaire ont été réalisés pour chacune des lignées cellulaires étudiées et 5000 à 10000 événements cellulaires ont été analysés pour chaque échantillon.

1.11 DÉTERMINATION DE L'ACTIVITÉ GÉLATINOLYTIQUE DE MMP-9 PAR DIGESTION ENZYMATIQUE DE GÉLATINE FLUORESCENTE ADSORBÉE SUR DES MICROSPHÈRES DE POLYÉTHYLÈNE

L'activité enzymatique de MMP-9 a été déterminée par cytométrie en flux, selon la technique précédemment décrite par St-Pierre *et al.* (1996), en mesurant le niveau de digestion de gélatine fluorescente préalablement adsorbée sur des microsphères de polyéthylène. Brièvement, les échantillons contenaient 90 µL de RPMI sans sérum, 5 µL d'une solution de MMP-9 et 5 µL de microsphères adsorbées de gélatine conjuguée à la fluorescéine (FITC). La réaction enzymatique a été effectuée dans des tubes Eppendorf incubés dans un bain-marie à 37°C pendant 2 h, et terminée par l'ajout de 1 mL de PBS froid, suivi de 2 lavages des microsphères dans du PBS par centrifugation (1 min à 8000 rpm). Les culots ont ensuite été resuspendus dans 500 µL de PBS avant l'analyse au cytofluomètre.

1.12 MESURE DE L'ACTIVITÉ HLE CONTENUE DANS DES LIQUIDES BAL

L'activité HLE contenue dans les liquides BAL a été déterminée à l'aide du substrat colorimétrique Meo-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-NA obtenu de la compagnie Sigma. Brièvement, 5 µL de différentes solutions appropriées de HLE purifiée (40-2000 ng) ou de liquides BAL (prédilués ou non) a été ajouté à 1 mL d'une solution de substrat [50 mM substrat; 0,1 M HEPES; 0,5 M NaCl; 5 % DMSO] dans des tubes Eppendorf. Les différents échantillons ont ensuite été incubés à la température ambiante, et l'augmentation de l'absorption des ondes lumineuses de 410 nm a été suivie pendant différents temps (15-60 min) à l'aide d'un spectrophotomètre de modèle Spectronic 1201 (Bausch & Lomb/Milton Roy, San Leandro, CA).

RÉSULTATS

1.0 RÉSULTATS OBTENUS AVEC DIFFÉRENTES LIGNÉES CELLULAIRES HUMAINES

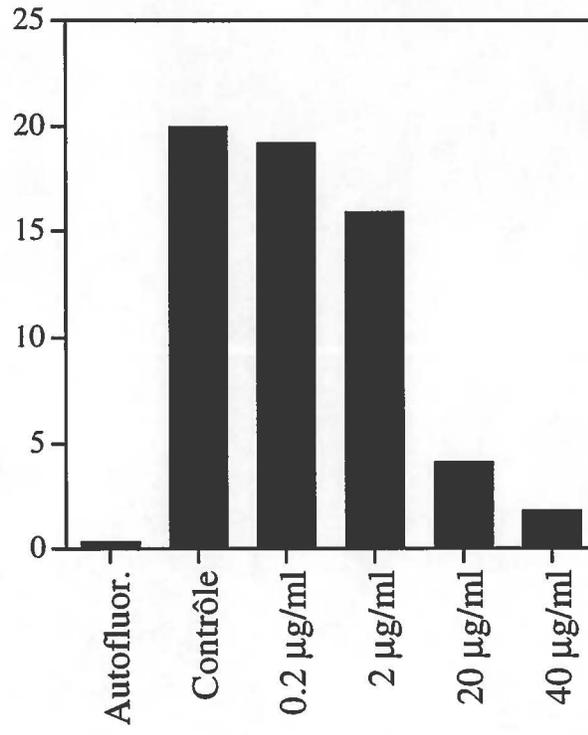
1.1 Protéolyse de ICAM-1 par l'élastase de leucocyte (HLE)

La protéolyse membranaire de ICAM-1 par l'élastase de leucocyte (HLE) a été investiguée dans un premier temps sur les cellules U-937, une lignée promyélocytaire humaine. Pour ce faire, les cellules ont été incubées pendant 2 h à 37°C dans du milieu sans sérum, en présence ou en absence de HLE exogène. L'expression de ICAM-1 a ensuite été mesurée par cytofluométrie en flux à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-ICAM-1 conjugué à la fluorescéine. Nos résultats montrent que l'utilisation de différentes concentrations de HLE (0,2 à 40 µg/mL) a induit des baisses d'expression de ICAM-1 qui étaient dépendantes des doses HLE utilisées (**Fig. 3**); des baisses d'expression variant de 5 à 90 % ont respectivement été enregistrées à la suite des différents traitements HLE variant de 0,2 à 40 µg/mL. Ces résultats sont représentatifs d'une série d'expériences indépendantes effectuées dans les mêmes conditions expérimentales. En général, des concentrations de HLE de 20 µg par mL étaient nécessaires pour obtenir des baisses d'expression de ICAM-1 de l'ordre de 50 à 75%. Des concentrations de 20 µg par mL de HLE ont donc été utilisées au cours des expériences qui ont suivies.

Figure 3: Effet de différentes concentrations de HLE sur l'expression membranaire de ICAM-1.

Des cellules U-937 ont été traitées pendant 2 h à 37°C avec différentes concentrations de HLE (0,2 à 40 µg/mL) ou sans HLE (contrôle). Les cellules ont ensuite été lavées afin d'analyser l'expression de ICAM-1 par cytofluométrie à l'aide d'un anti-ICAM-1 conjugué à la fluorescéine (B-H17). Le niveau d'expression de ICAM-1 est exprimé en unités arbitraires déterminées selon l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) mesurée sur 10000 cellules. Le niveau d'autofluorescence (Autofluor.) a été déterminé en incubant les cellules en absence d'anticorps. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Expression de ICAM-1



1.2 Inhibition de la baisse d'expression de ICAM-1 induite par HLE en présence d'inhibiteurs de protéases

1.2.1 α 1-antitrypsine (α 1-AT)

Afin de valider l'hypothèse que les baisses d'expression de ICAM-1 médiée par HLE étaient principalement dues à l'activité catalytique de HLE, des expériences ont été conduites en présence de α 1-antitrypsine (α 1-AT), un inhibiteur de sérines protéases (dont HLE et la cathepsine G) présent en importante quantité dans le plasma sanguin. Selon des considérations de nature stœchiométrique, c'est-à-dire i) en comparant la masse moléculaire de α 1-AT (52-55 kDa) avec celle de HLE (30 kDa) et ii) en connaissant la nature du type d'inhibition (formation de complexe 1:1 de α 1-AT/HLE), nous avons pu déterminer une concentration efficace de α 1-AT (~100 μ g/mL) suffisamment importante pour inhiber 20 μ g/mL de HLE. Nos résultats montrent que la présence de α 1-AT purifiée (100 μ g/mL) lors du traitement HLE (20 μ g/mL) a complètement inhibé la baisse d'expression de ICAM-1 (~70%) induite par HLE (**Fig. 4**).

D'autres expériences ont également été conduites afin d'étudier l'association directe de α 1-AT avec HLE. Étant donné que l'association directe du site actif de α 1-AT avec le site catalytique de HLE entraîne la formation de deux liens covalents entre les complexes α 1-AT/HLE (Roberts *et al.*, 1995), nous avons pu étudier la formation de ces complexes indissociables par SDS-PAGE. Par ailleurs, lorsque les concentrations molaires de HLE sont équivalentes ou supérieures à celles de α 1-AT, HLE a été rapportée comme étant capable d'inhiber l'activité inhibitrice de α 1-AT par protéolyse partielle entraînant alors la fragmentation de α 1-AT (52-55 kDa) en deux produits de digestion: un fragment de 47,8 kDa et un fragment de 4,2 kDa qui possède une puissante activité chimiotactique envers les PMN (Banda *et al.*, 1988). Pour observer la protéolyse partielle de α 1-AT par HLE ainsi que la formation des complexes α 1-AT/HLE stables, une quantité fixe de α 1-AT (2 μ g) a donc été incubée en présence ou en absence d'une quantité équimolaire (i.e. équivalente au niveau molaire) de HLE (1 μ g) pendant 1 h à 37°C. Les produits de la réaction enzymatique ont ensuite été visualisés par SDS-PAGE (**Fig. 5**). Une bande majeure de masse moléculaire légèrement inférieure à celle obtenue pour α 1-AT natif seul est alors apparue en présence de α 1-AT+HLE et correspond au fragment connu de 47,8 kDa pour α 1-AT inactivée. Une faible bande de masse moléculaire supérieure à α 1-AT natif correspondant à la formation de complexes α 1-AT/HLE stables est également détectable. Ces résultats montrent donc la capacité de HLE d'effectuer la digestion de α 1-AT lorsque les concentrations molaires de HLE deviennent équivalentes à celles de α 1-AT.

1.2.2 MSAAPVCK

L'efficacité d'un deuxième inhibiteur de HLE, le méthoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-chlorométhyl cétone (MSAAPVCK), a également été évalué. Cet inhibiteur peptidique possède une très grande spécificité envers le site catalytique de HLE (Nakajima et Powers, 1979; McRae *et al.*, 1980). Différentes concentrations de MSAAPVCK (0,002 à 200 mM) ont été utilisées afin de confirmer la protéolyse de ICAM-1 par HLE (20 µg/mL). Nos résultats montrent que des concentrations de MSAAPVCK supérieures ou égales à 2 mM se sont avérées nécessaires pour inhiber complètement la protéolyse de ICAM-1 par 20 µg par mL de HLE (**Fig. 6**).

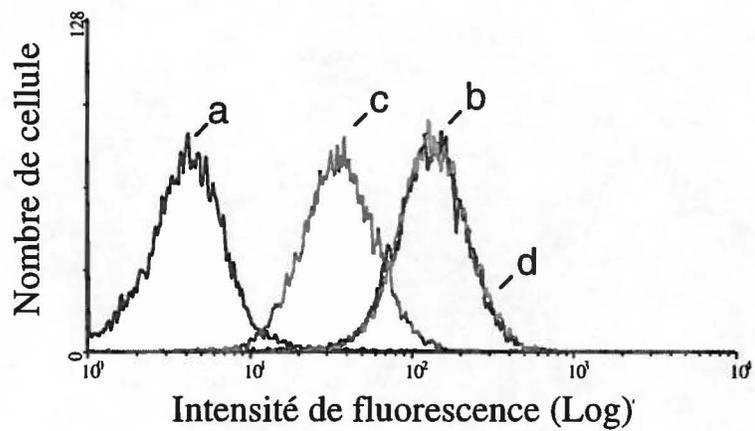
1.2.3 Sérum humain et sérum fœtal de veau (SFV)

La baisse d'expression de ICAM-1 par HLE a été évaluée en présence de sérum humain ou de sérum fœtal de veau (SFV), chacun contenant des concentrations physiologiques d'inhibiteurs de protéases, notamment l' α 1-AT et l' α 2-MG, deux principaux inhibiteurs plasmatiques de HLE. Nos résultats montrent que l'expression de ICAM-1 n'a pas été affectée à la suite de différents traitements HLE (0,8 à 20 µg/mL) lorsque effectués en présence de 10% (v/v) de sérum humain ou de 10% (v/v) de SFV, indiquant que la concentration des inhibiteurs plasmatiques est suffisamment importante pour empêcher la protéolyse de ICAM-1 par l'ajout de HLE exogène (**Fig. 7**).

Figure 4: Inhibition de la protéolyse de ICAM-1 par HLE en présence de l'inhibiteur naturel α 1-antitrypsine (α 1-AT).

Les cellules U-937 ont été traitées pendant 2 h avec HLE (20 μ g/mL) ou sans HLE (contrôle) en présence ou en absence d' α 1-AT (100 μ g/mL). Les cellules ont ensuite été lavées et l'expression de ICAM-1 a été évaluée par cytofluométrie à l'aide d'un anti-ICAM-1 conjugué à la fluorescéine (B-H17). A) Juxtaposition de profils de cytofluométrie de l'expression de ICAM-1 avec le nombre de cellule (en ordonnée) versus l'intensité de fluorescence du marquage de ICAM-1 (en abscisse); profil a = contrôle d'autofluorescence; profil b = contrôle positif (cellules non-traitées); profils c et d = cellules traitées avec HLE sans et avec α 1-AT, respectivement. B) Niveau d'expression de ICAM-1 exprimé en unités arbitraires déterminées selon l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) mesurée sur 10000 cellules. Le niveau d'autofluorescence (Autofluor.) a été déterminé en incubant les cellules en absence d'anticorps. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

A.



B.

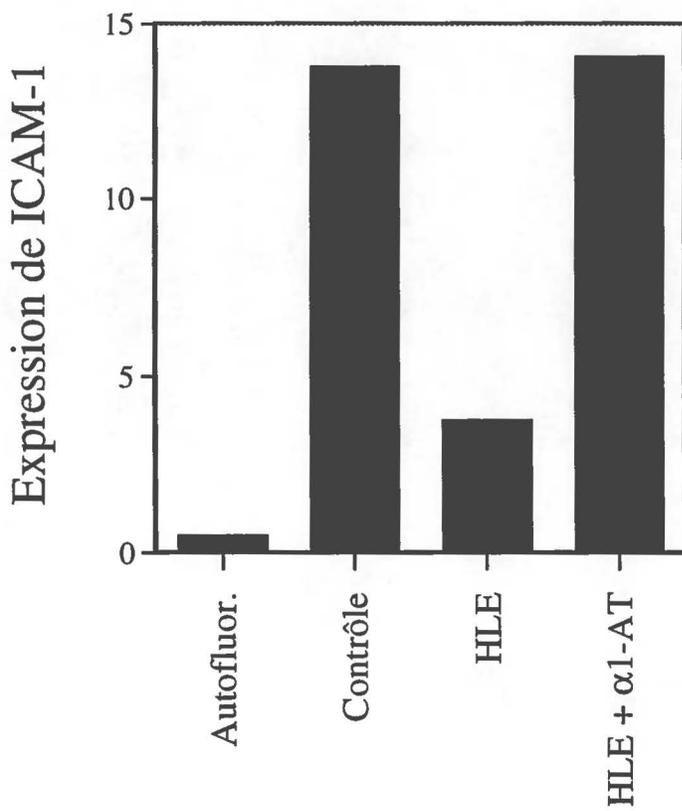
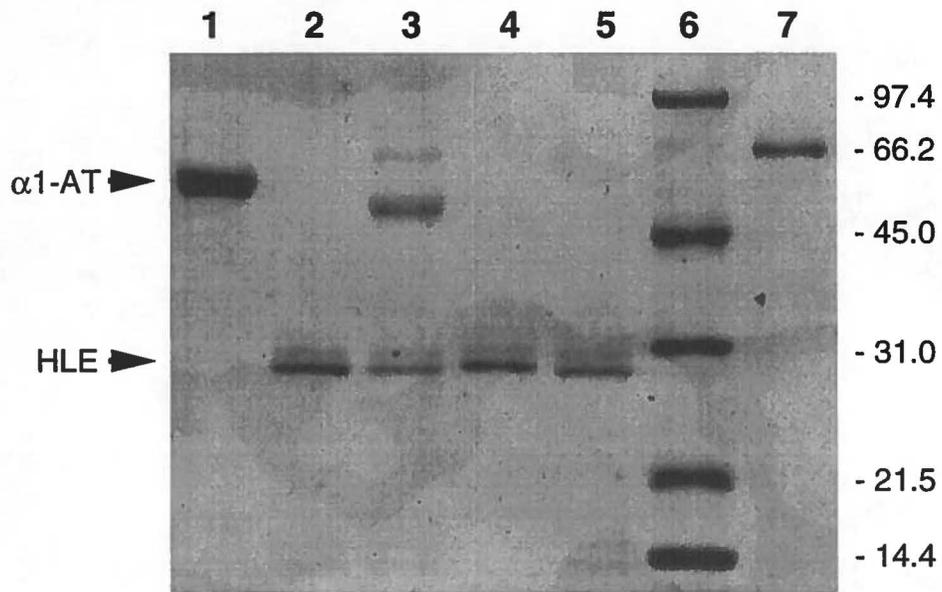


Figure 5: Analyse de la formation des complexes α 1-AT/HLE.

HLE (1 μ g) a été incubé en présence ou en absence d'une concentration équimolaire de α 1-AT (2 μ g) pendant 1 h à 37°C. Les échantillons ont ensuite été soumis à une électrophorèse de type SDS-PAGE (12%) en condition réductrice. Les protéines ont été colorées avec le bleu de Coomassie.



Légende

1: $\alpha 1$ -AT

2: HLE

3: $\alpha 1$ -AT + HLE

4: MSAAPVCK + HLE

5: HLE (4°C)

6: Marqueurs de poids moléculaires

7: BSA

Figure 6: Inhibition de la protéolyse de ICAM-1 par HLE en présence de l'inhibiteur peptidique MSAAPVCK.

Les cellules U-937 ont été traitées pendant 2 h avec HLE (20 µg/mL) en présence ou en absence de MSAAPVCK (0,002 à 200 mM). Les cellules ont ensuite été lavées et l'expression de ICAM-1 a été évaluée par cytofluométrie à l'aide d'un anti-ICAM-1 conjugué à la fluorescéine (B-H17). Le niveau d'expression de ICAM-1 est exprimé en unités arbitraires déterminées selon l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) mesurée sur 10000 cellules. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

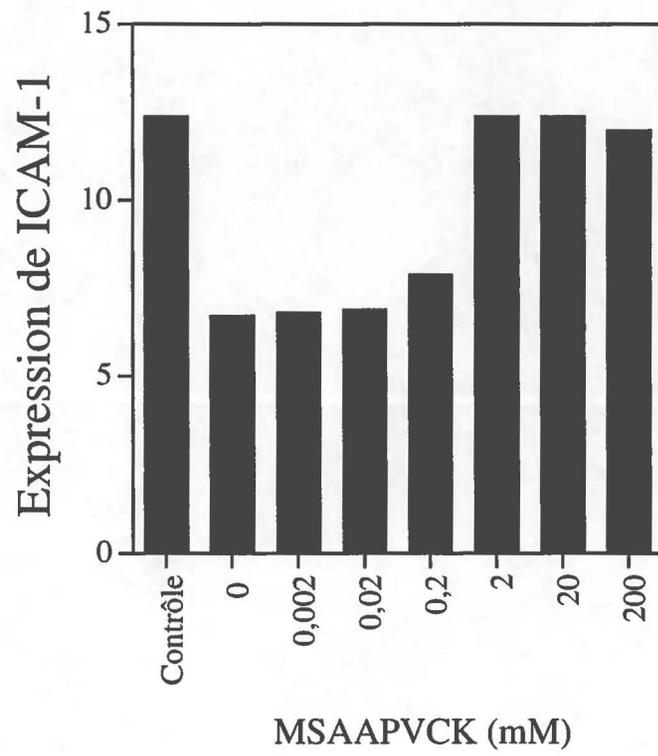
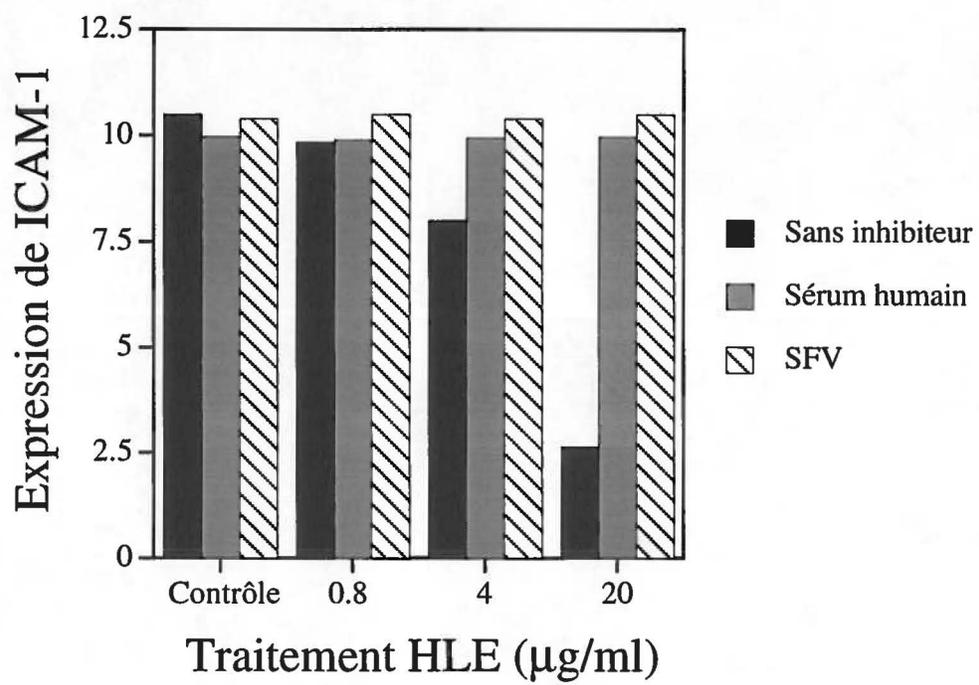


Figure 7: Inhibition de la protéolyse de ICAM-1 par HLE en présence de sérum humain ou de SFV.

Les cellules U-937 ont été traitées pendant 2 h avec HLE (0,8 – 20 µg/mL) ou sans HLE (contrôle) en présence ou en absence de sérum humain (10% v/v) ou de SFV (10% v/v). Les cellules ont ensuite été lavées et l'expression de ICAM-1 a été évaluée par cytofluométrie à l'aide d'un anti-ICAM-1 conjugué à la fluorescéine (B-H17). Le niveau d'expression de ICAM-1 est exprimé en unités arbitraires déterminées selon l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) mesurée sur 10000 cellules.

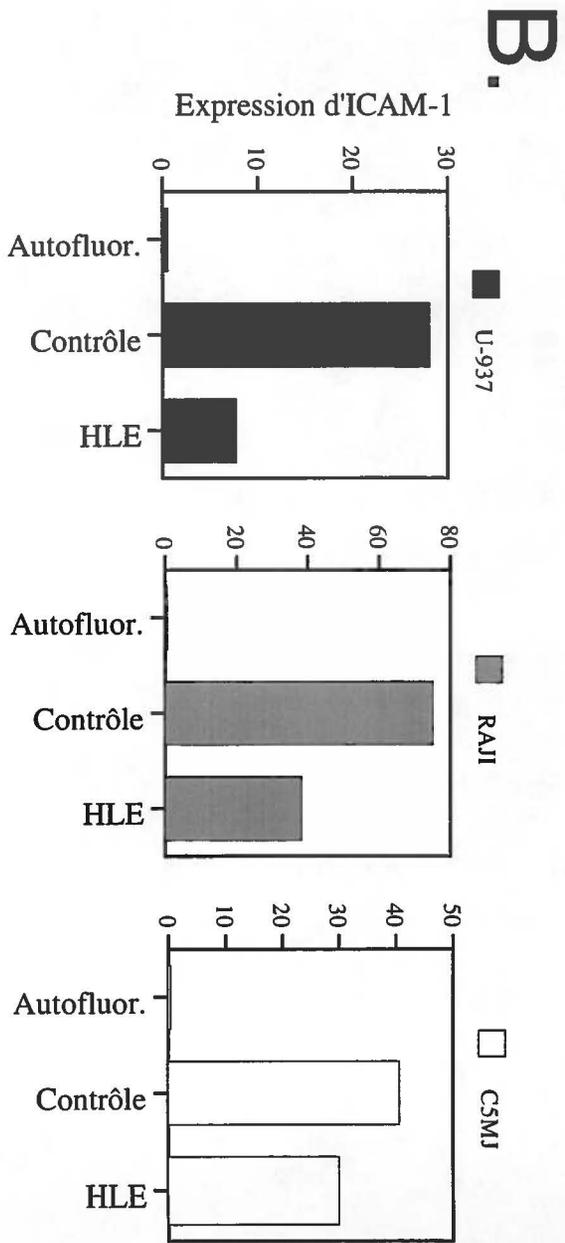
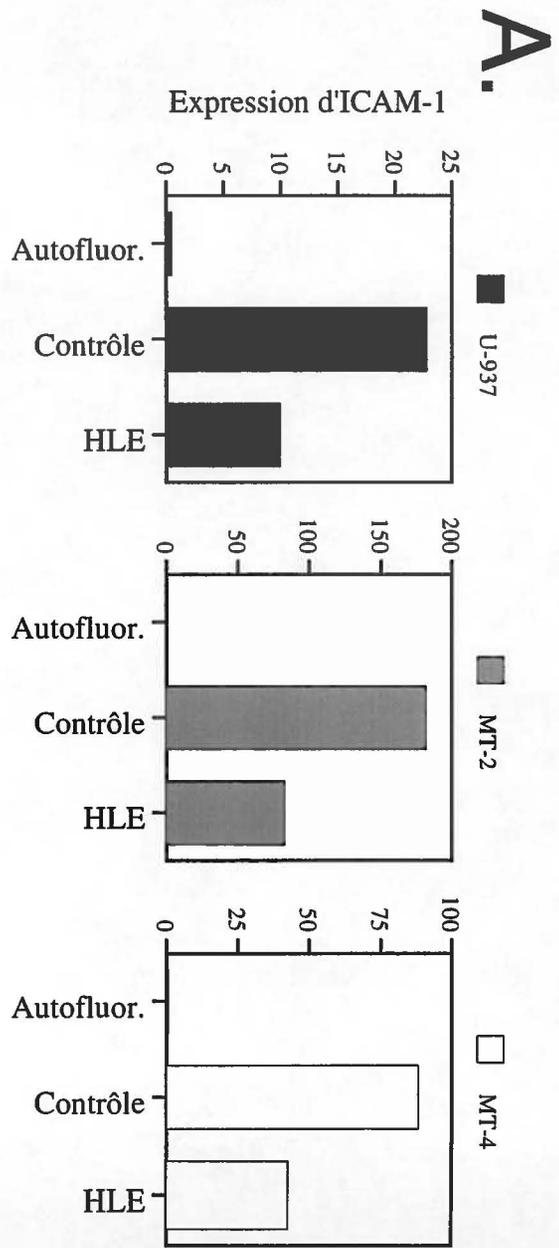


1.3 Analyse de l'expression de ICAM-1 sur différentes lignées cellulaires humaines prétraitées avec HLE

La protéolyse de ICAM-1, observée sur les cellules U937 à la suite d'un traitement HLE, a été investiguée sur d'autres types cellulaires. Des résultats préliminaires de cytofluométrie avaient révélé d'importants niveaux d'expression de ICAM-1 à la surface des cellules MT-2, MT-4 et C5MJ, trois lignées cellulaires humaines de lymphocytes T, ainsi que sur les cellules Raji, une lignée de lymphocytes B humains. Des études comparatives entre ces quatre lignées lymphocytaires et la lignée promonocytaire U-937 ont été effectuées afin d'évaluer leur sensibilité respective à la protéolyse de ICAM-1 par HLE (20 µg/mL). Nos résultats montrent que les niveaux de clivage de ICAM-1 sur les lignées MT-2, MT-4 et U-937 sont similaires, et ce, malgré le fait que les cellules MT-2 et MT-4 exprimaient davantage ICAM-1 à leur surface (i.e. 8 et 4 fois plus selon leur MFI respectif) par rapport aux cellules U-937 (**Fig. 8A**). Des résultats provenant d'une autre expérience montrent également en parallèle des baisses d'expression de ICAM-1 par HLE (20 µg/mL) à la surface des cellules C5MJ (~26%), Raji (~49%) et U-937 (~72%) (**Fig. 8B**). La baisse d'expression est toutefois moins importante à la surfaces des cellules C5MJ par rapport aux cellules U-937, et ce malgré des niveaux d'expression de ICAM-1 assez semblables sur C5MJ (MFI=40,6) et U-937 (MFI=28.1). D'autres expériences comparant la protéolyse de ICAM-1 entre les cellules U-937 et C5MJ ont cependant révélé des différences de clivage beaucoup moins accentuées que celles observées à la figure 8B (résultats non-montrés). À la lumière de ces résultats, les molécules ICAM-1 de C5MJ sembleraient plus résistantes à la protéolyse par HLE par rapport aux cellules U-937. Un phénomène de résistance à la protéolyse de ICAM-1 par HLE qui fluctuait d'une expérience à l'autre a également été observé sur les cellules THP-1, une lignée monocytaire humaine; une résistance pratiquement complète à la protéolyse de ICAM-1 a pu être enregistrée par deux fois dans deux expériences indépendantes (résultats non-montrés). L'expression constitutive de ICAM-1 étant instable sur cette lignée cellulaire, l'IFN- γ a été utilisé afin d'augmenter l'expression de ICAM-1; cependant, aucune résistance majeure à la protéolyse de ICAM-1 par HLE n'a pu être réobservée. La raison expliquant ce phénomène transitoire de résistance à la protéolyse de ICAM-1 par HLE n'a pu être identifiée et caractérisée.

Figure 8: Protéolyse membranaire de ICAM-1 par HLE sur différentes lignées cellulaires humaines.

Les cellules U-937, MT-2, MT-4, C5MJ et RAJI ont été traitées pendant 2 h à 37°C avec (20 µg/ml) ou sans HLE. L'expression de ICAM-1 a ensuite été analysée par cytofluométrie à l'aide d'un anti-ICAM-1 conjugué à la fluorescéine (B-H17). Le niveau d'expression de ICAM-1 est exprimé en unités arbitraires déterminées selon l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) mesurée sur 10000 cellules. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes (A et B).

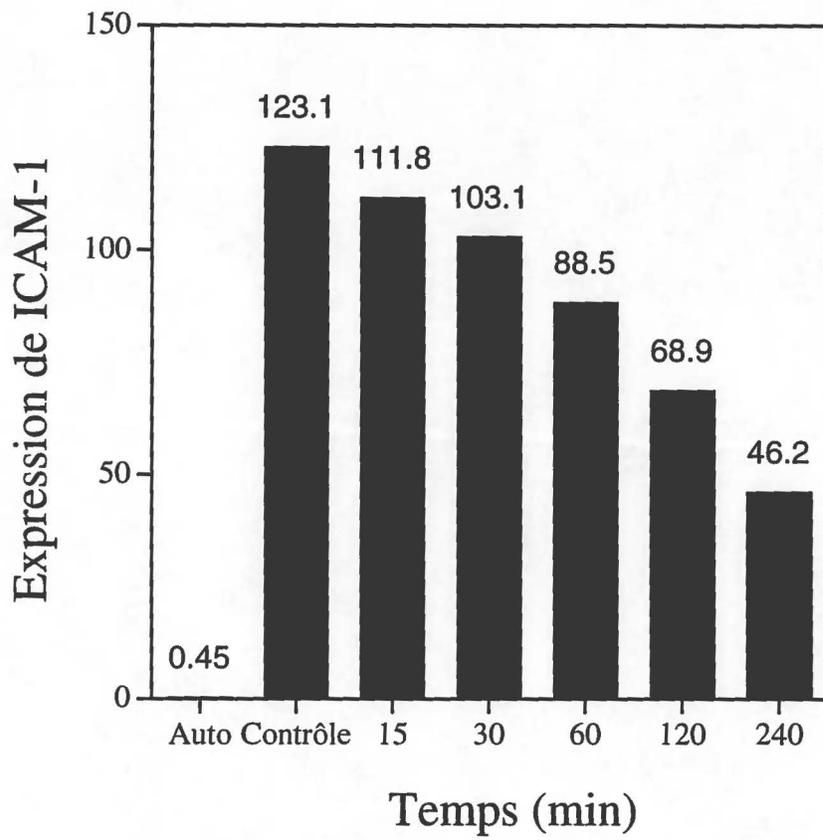


1.4 Cinétique du clivage de ICAM-1 par HLE

Des temps d'incubation de 2 h en présence de HLE (20µg/mL) avait jusqu'à maintenant constamment été utilisés afin d'induire la protéolyse membranaire de ICAM-1. Des études de cinétique sur le clivage de ICAM-1 par HLE ont été effectuées dans le but d'optimiser la réaction enzymatique. Des cellules MT-2 ont été traitées pendant différents temps (15 à 240 min) avec HLE (20 µg/mL). Des baisses d'expressions de ICAM-1 fluctuant de 9 à 62 % ont respectivement été observées après des temps d'incubations variant de 15 à 240 min en présence de HLE (**Fig. 9**). Ces résultats indiquent que la protéolyse de ICAM-1 par HLE est fonction du temps, et qu'un temps d'incubation d'au moins 2 h est nécessaire pour observer des baisses importantes d'expression de ICAM-1 de ~50% par 20 µg/mL de HLE.

Figure 9: Cinétique du clivage membranaire de ICAM-1 par HLE.

Les cellules MT-2 ont été traitées à 37°C pendant différents temps d'incubation (15 à 240 min) en présence (20 µg/mL) ou en absence (contrôle) de HLE. L'expression de ICAM-1 a ensuite été évaluée par cytofluométrie à l'aide d'un anti-ICAM-1 conjugué à la fluorescéine (B-H17). Le niveau d'expression de ICAM-1 est exprimé en unités arbitraires déterminées selon l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) mesurée sur 10000 cellules. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

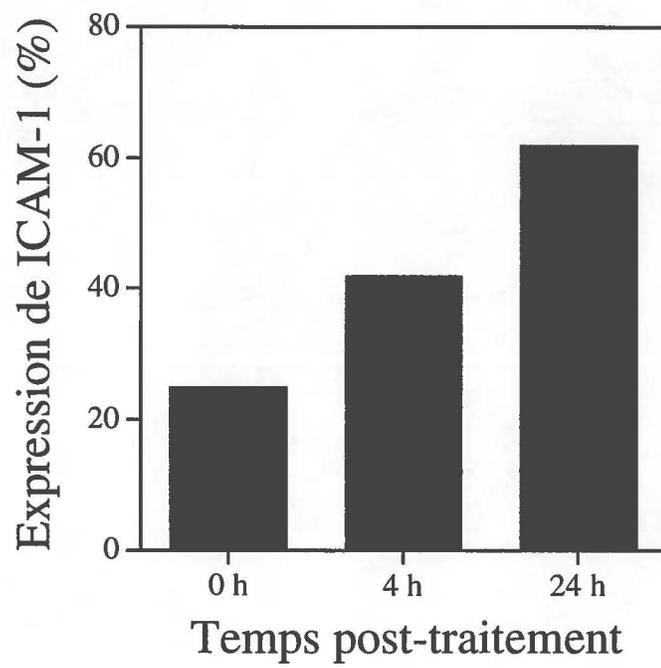


1.5 Réexpression de ICAM-1 suite à une protéolyse membranaire

La réexpression de ICAM-1 à la suite d'un traitement HLE a été évaluée par cytofluométrie afin de déterminer si les baisses d'expression de ICAM-1 observées étaient temporaires ou permanentes. Pour se faire, des cellules U-937 ont été traitées pendant 2 h avec HLE (20 µg/mL). Après lavages, les cellules ont été remises en culture et les niveaux d'expression de ICAM-1 ont été déterminés à différents intervalles après la fin du traitement. Des analyses de cytofluométrie ont révélé que les molécules ICAM-1 étaient graduellement réexprimées suite à un traitement HLE après des temps d'incubation de 4 et de 24 h (**Fig. 10**). Ces résultats indiquent que la protéolyse de ICAM-1 par HLE n'entraîne pas une baisse d'expression irréversible de ICAM-1 à la surface des cellules U-937.

Figure 10: Réexpression de ICAM-1 suite à une protéolyse membranaire.

Les cellules U-937 ont été traitées pendant 2 h à 37°C en présence (20 µg/mL) ou en absence (contrôle) de HLE. Les cellules ont ensuite été lavées puis remises en culture à 37°C dans du milieu RPMI complet (10% SFV) pendant différents temps. L'expression de ICAM-1 a été évaluée par cytofluométrie pour chacun des temps d'incubation post-traitement. Le niveau d'expression de ICAM-1 est exprimé en pourcentage et a été calculé selon l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) des cellules traitées par rapport aux cellules non-traitées.



1.6 Aspects spécificités du clivage protéolytique de ICAM-1 par HLE

Pour évaluer la spécificité de ICAM-1 comme substrat de HLE, différentes approches ont été utilisées.

1.6.1 Évaluation de la protéolyse de ICAM-1 par MMP-9

Dans une première série d'expériences, nous avons évalué le clivage de ICAM-1 en présence de différentes concentrations de MMP-9 humain (Gélatinase B; E.C. 3.4.24.35), purifié par chromatographie d'affinité à partir de surnageants de cellules monocytaires THP-1 stimulées au PMA. Son activité catalytique a été confirmée par cytofluométrie en flux (**Fig. 11B**) en mesurant la digestion de gélatines (collagène dénaturé) fluorescentes adsorbées sur des microsphères de polyéthylène (St-Pierre *et al.*, 1996). La protéolyse de ICAM-1 par MMP-9 a été évaluée puisque tout comme HLE, MMP-9 est exprimée par les leucocytes et possède la capacité de cliver plusieurs glycoprotéines de la matrice extracellulaire. De plus, des activités catalytiques MMP-dépendantes ont été associées au clivage des récepteurs membranaires tels que le récepteur du TNF, les sélectines de type L (L-Selectine) et ICAM-1 (Lyons et Benveniste, 1998). Dans le cas de MMP-9, cependant, aucune protéolyse de ICAM-1 n'a pu être observée, et ce, malgré l'utilisation de concentrations de MMP-9 atteignant même les 60 µg/mL (**Fig. 11A**).

1.6.2 Sensibilité respective des molécules ICAM-1, CD4 et HLA-DR à la protéolyse par HLE

Dans une seconde série d'expériences, nous avons comparé la sensibilité à la protéolyse par HLE de ICAM-1, de HLA-DR et de CD4, trois membres de la superfamille des Ig fortement exprimés à la surface des cellules MT-2. La protéolyse de CD4 a été évaluée à titre de témoin positif puisque cette molécule est sensible à HLE (Döring *et al.*, 1995). Le clivage protéolytique de ICAM-1, de CD4 et de HLA-DR a également été évalué en parallèle avec différentes concentrations de trypsine ou de chymotrypsine bovines, deux protéases du tractus digestif bien connues pour leur activité protéolytique à large spectre. Nos résultats montrent que le traitement HLE (20 µg/mL) a réduit significativement et de façon similaire l'expression de ICAM-1 (~58 %) et de CD4 (~70 %) (**Fig. 12**); par contre, l'expression de HLA-DR n'a aucunement été affectée par le traitement HLE. Ces résultats corroborent ceux de Döring *et al.* (1995). La trypsine et la chymotrypsine, à différentes concentrations (0,2 à 200 µg/ml), ont également induit de façon dose-dépendante la protéolyse de ICAM-1 (0-95%) et de CD4 (0-95%) (**Fig. 13**). Tout comme HLE, ces deux protéases ont été incapables de cliver HLA-DR malgré l'utilisation de concentrations élevées (200 µg/mL). Ces résultats montrent donc que: i) les molécules

ICAM-1 et CD4 ont une sensibilité comparable au clivage par HLE, par la trypsine, et la chymotrypsine, et ii) les molécules HLA-DR sont résistantes à la protéolyse par ces mêmes protéases.

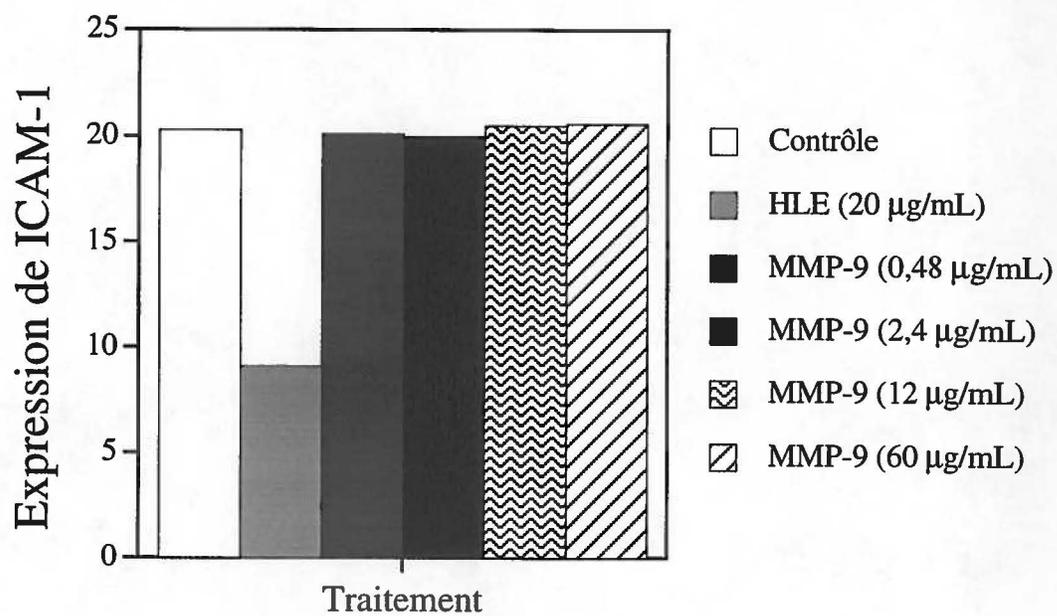
1.6.3 Inhibition de la protéolyse de ICAM-1 par HLE à l'aide d'un AcM dirigé contre le domaine N-terminal de ICAM-1

Dans le but d'inhiber spécifiquement la protéolyse de ICAM-1 par HLE, un AcM (RR1/1) dirigé contre le premier domaine N-terminal de ICAM-1 (i.e. D1) a été utilisé. Des cellules U-937 ont été préincubées à 4°C en présence de concentrations saturantes de RR1/1, déterminées lors d'expériences préliminaires. Les cellules ont ensuite été lavées pour enlever les anti-ICAM-1 non-fixés puis incubées pendant 2 h à 37°C avec HLE (20µg/mL). Les résultats démontrent que la liaison de ICAM-1 avec RR1/1 bloque le clivage par HLE. En effet, des analyses de cytofluométrie ont révélé que les traitements HLE avaient induit des baisses d'expression de ICAM-1 seulement au niveau des cellules qui n'avaient pas été préincubées avec RR1/1 (**Fig. 14**); par ailleurs, la partie Fc de RR1/1 n'a pas été protéolysée par HLE puisque sa liaison avec l'anticorps anti-Fc n'a pas été affectée. Ces résultats montrent donc que l'AcM RR1/1 protège ICAM-1 contre l'activité catalytique de HLE probablement par encombrement stérique ce qui empêcherait alors la fixation de HLE au niveau ou à proximité du premier domaine N-terminal de ICAM-1 (i.e. D1).

Figure 11: Évaluation de la protéolyse de ICAM-1 par MMP-9.

A) Les cellules U-937 ont été traitées pendant 2 h à 37°C avec HLE (20 µg/mL) ou différentes concentrations de MMP-9 (0,480-60 µg/mL), ou sans protéase (contrôle). L'expression de ICAM-1 a ensuite été évaluée par cytofluométrie à l'aide d'un anti-ICAM-1 conjugué à la fluorescéine (B-H17). Le niveau d'expression de ICAM-1 est exprimé selon l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) mesurée sur 10000 cellules. B) Activité gélatinolytique de MMP-9 mesurée par cytofluométrie à l'aide de microsphères adsorbées de gélatines fluorescentes. Le pourcentage de dégradation de gélatine a été calculé selon le MFI de 5000 microsphères en présence ou non (contrôle) de MMP-9. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.

A.



B.

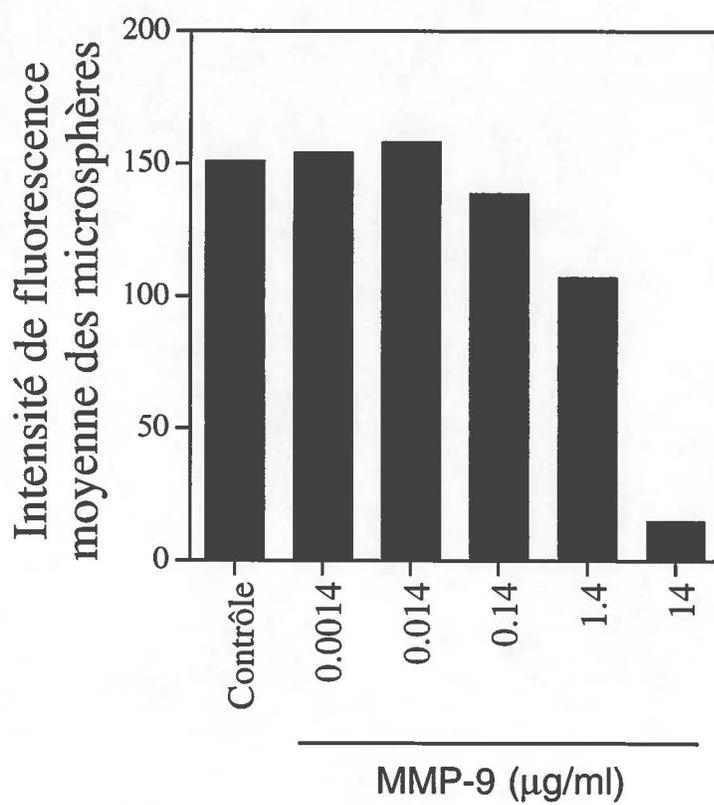


Figure 12: Évaluation de la protéolyse de ICAM-1, CD4, et de HLA-DR par HLE. Des cellules MT-2 ont été traitées pendant 2 h à 37°C avec (20 µg/mL) ou sans HLE. L'expression des molécules ICAM-1, CD4 et de HLA-DR a ensuite été évaluée par cytofluométrie à l'aide des AcM suivant: B-H17, MT-310 et CR3/43. Le niveau d'expression de ICAM-1 est exprimé en unités arbitraires déterminées selon l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) mesurée sur 10000 cellules et le pourcentage de protéolyse a été établi selon les valeurs obtenues en absence de HLE. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

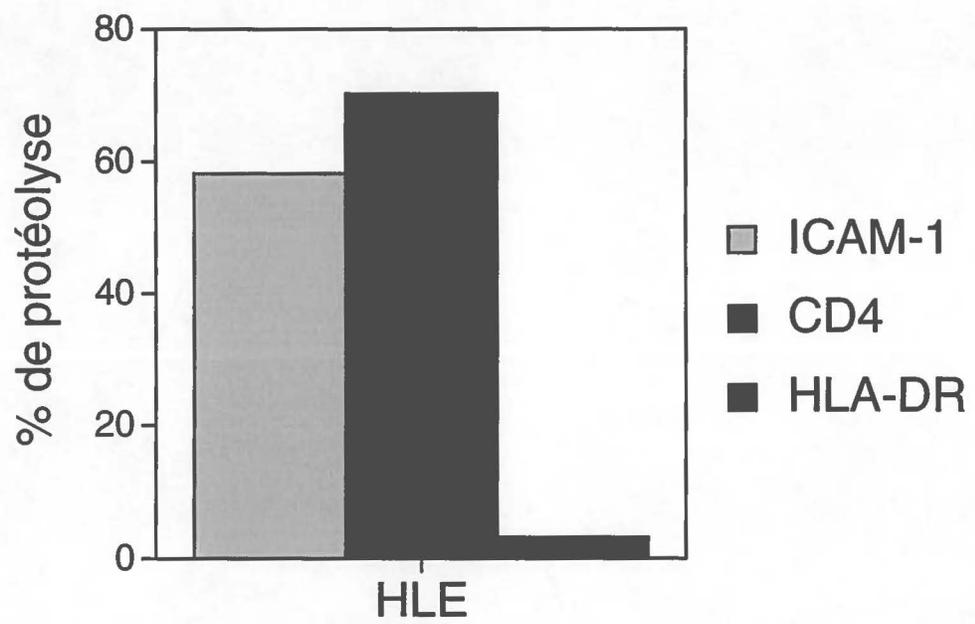
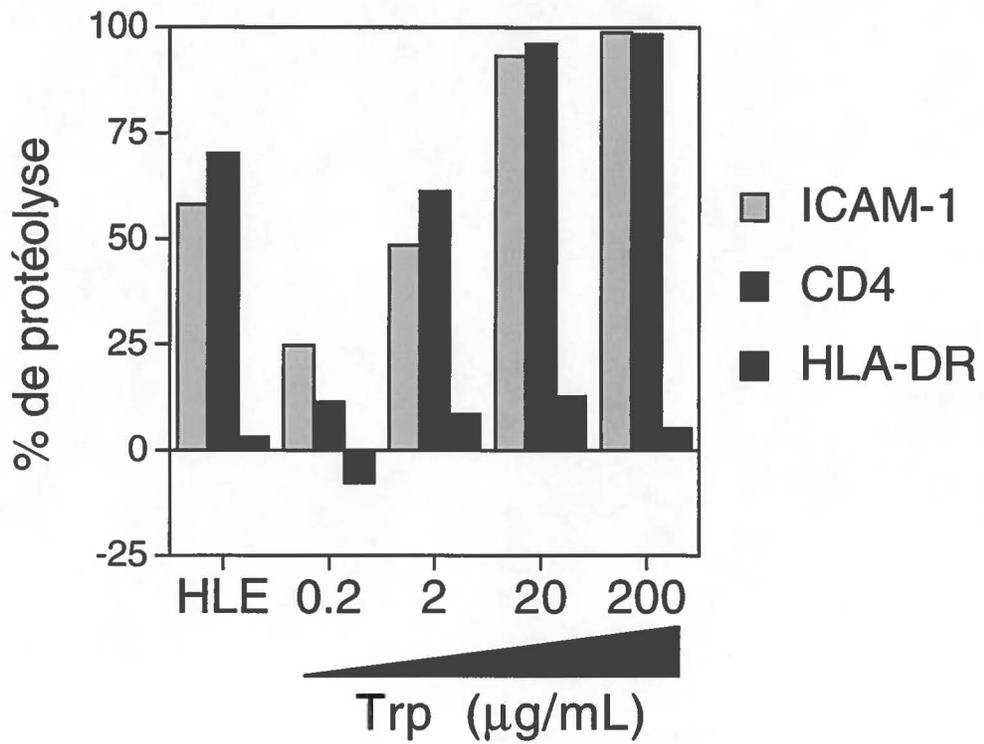


Figure 13: Évaluation de la protéolyse de ICAM-1, CD4 et HLA-DR par la trypsine et chymotrypsine bovines.

Des cellules MT-2 ont été traitées pendant 2 h à 37°C avec HLE (20 µg/mL) ou différentes concentrations de trypsine ou chymotrypsine bovines (0,2 - 200 µg/mL). L'expression des molécules ICAM-1, CD4 et HLA-DR a ensuite été évaluée par cytofluométrie à l'aide d'AcM. Les niveaux d'expression ont été évalués selon l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) mesurée sur 10000 cellules et le pourcentage de protéolyse établi selon les valeurs obtenues en absence de HLE.

HLE vs Trypsine



HLE vs Chymotrypsine

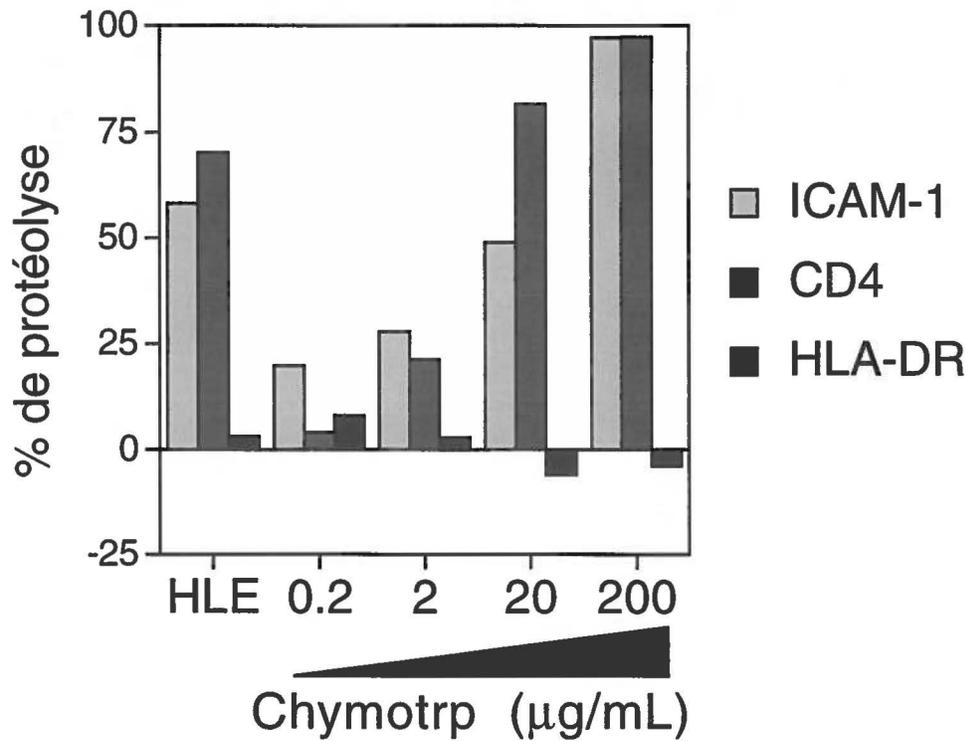
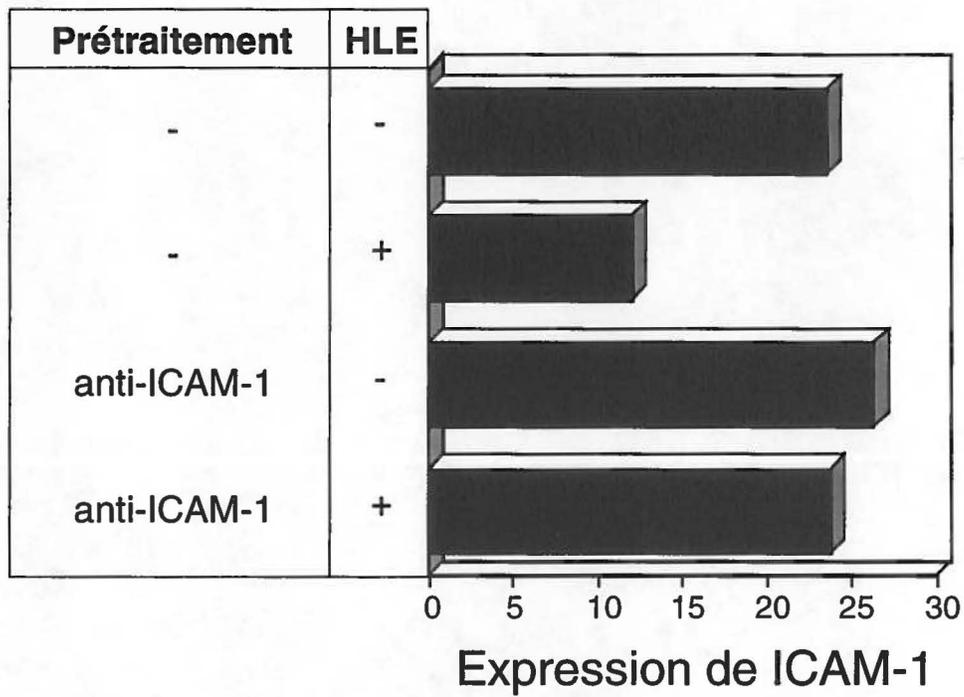


Figure 14: Inhibition de la protéolyse de ICAM-1 par HLE à l'aide d'un AcM dirigé contre le domaine N-terminal de ICAM-1.

Des cellules U-937 ont été incubées pendant 30 min à 4°C en présence ou en absence de l'anti-ICAM-1 RR1/1. Après lavages, les cellules ont été traitées avec (20µg/ml) ou sans HLE pendant 2 h à 37°C. Par la suite, les cellules ont été lavées puis incubées pendant 30 min à 4°C en présence d'anticorps RR1/1. L'expression de ICAM-1 a alors été évaluée à l'aide d'un antiserum anti-Fc de souris conjugué à la fluorescéine (FITC). Le niveau d'expression de ICAM-1 est exprimé en unités arbitraires déterminées selon l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) mesurée sur 10000 cellules. Les résultats sont représentatifs de deux expériences indépendantes.



2.0 RÉSULTATS OBTENUS À L'AIDE D'UNE FORME RECOMBINANTE SOLUBLE DE ICAM-1 (rsICAM-1)

Dans le but d'évaluer la protéolyse directe de ICAM-1 par HLE, des analyses électrophorétiques de type SDS-PAGE ont été effectuées à l'aide d'une forme recombinante soluble de la partie extracellulaire (D1-D5) de ICAM-1 humain (rsICAM-1). Ces analyses ont entre autre permis d'évaluer différents aspects biochimiques tels les fragments générés par protéolyse ainsi que l'effet de la glycosylation de ICAM-1.

2.1 Évaluation de la protéolyse de rsICAM-1 par HLE

L'évaluation de la protéolyse de rsICAM-1 (5 µg) par HLE a été entreprise dans un premier temps avec différentes concentrations de HLE (0,04 à 1 µg). Une bande diffuse observée sur gel SDS-PAGE et variant de 60 à 100 kDa représente la forme purifiée de rsICAM-1 fortement glycosylée (**Fig. 15**). L'analyse électrophorétique démontre que l'incubation de ICAM-1 avec HLE induit un clivage protéolytique de rsICAM-1. Deux bandes diffuses (~30 et 45 kDa) de masse moléculaire inférieure sont apparues à la suite du traitement protéolytique: La bande diffuse de 45 kDa représente un produit de digestion de rsICAM-1, et celle de 30 kDa, représente vraisemblablement HLE puisque ce dernier possède une masse moléculaire de 29.5 kDa. La différence de l'intensité des bandes de HLE seul ou en présence de ICAM-1 est probablement due à un phénomène d'autocatalyse de HLE en absence de substrat. La bande de 30 kDa pourrait également correspondre à un produit de digestion de rsICAM-1.

Des analyses de séquençage de protéines ont ensuite été effectuées sur les deux bandes obtenues (45 et 30 kDa) afin d'identifier le(s) site(s) de clivage. Ces analyses, réalisées selon la méthode de dégradation d'Edman, ont cependant échoué à multiples reprises vraisemblablement dû à l'importante glycosylation de ICAM-1 qui cause un « blocage N-terminal », une observation précédemment rapportée pour ICAM-1 par Staunton *et al.* (1988). Par ailleurs, notre incapacité à pouvoir identifier le site de clivage n'est vraisemblablement pas due à la procédure expérimentale puisque la molécule HLE a pu être identifiée par séquençage partiel à partir de la bande de 30 kDa.

2.2 Effet de la N-glycosylation de rsICAM-1 sur son clivage par HLE

ICAM-1 possède de nombreux sites potentiels (i.e. huit) de glycosylation de type N-lié au niveau de sa partie extracellulaire (Bloom *et al.*, 1996). Des formes hypoglycosylées (80 kDa) ainsi qu'hyperglycosylées (114 kDa) ont été décrites et dépendent du type cellulaire

qui les exprime (Dustin *et al.*, 1986). La glycosylation différentielle de ICAM-1 pourrait donc avoir d'importantes répercussions sur sa protéolyse par HLE puisque certains oligosaccharides pourraient camoufler certains sites de clivage. Afin de tester cette hypothèse, nous avons préalablement traité rsICAM-1 avec la N-glycosidase F de *Flavobacterium meningosepticum* afin de générer des formes déglycosylées de rsICAM-1 avant le clivage par HLE. Des analyses électrophorétiques de type SDS-PAGE ont confirmé l'efficacité de la déglycosylation de rsICAM-1 par l'apparition de plusieurs bandes sous-jacentes (**Fig. 16A**). Parmi ces bandes, une fine bande de faible masse moléculaire (~50-60 kDa) se distingue et représente vraisemblablement une forme entièrement déglycosylée de rsICAM-1 étant donné que la masse moléculaire de ICAM-1 non-glycosylé se situe autour de 55 à 60 kDa selon sa séquence en acides aminés (Rothlein *et al.*, 1986). L'addition de HLE à rsICAM-1, préalablement traité ou non avec la N-glycosidase, a révélé après 1 heure d'incubation que les formes natives (glycosylées) et déglycosylées étaient tous protéolysées par HLE (**Fig. 16A**). Cependant, après 4 h d'incubation bien que les formes natives aient complètement été digérées par HLE, des formes déglycosylées étaient toujours détectables en quantité importante. Ces résultats indiquent donc que la glycosylation de rsICAM-1 ne protège pas rsICAM-1 contre la dégradation enzymatique par HLE, mais la présence d'oligosaccharides semblerait même favoriser légèrement sa protéolyse.

2.3 Effet de l'acide sialique de rsICAM-1

De nombreux résidus d'acides sialiques sont ajoutés à la surface de ICAM-1 lors des modifications post-traductionnelles. Sur les cellules endothéliales, le TNF- α induit une augmentation de résidus d'acides sialiques à la surface de ICAM-1 (Hanasaki *et al.*, 1994). Ces résidus qui possèdent une forte charge négative affectent donc la charge nette de ICAM-1 ce qui pourrait théoriquement favoriser sa protéolyse par HLE puisque HLE possède une importante charge nette positive (Remold-O'Donnell et Parent, 1995). Afin d'étudier, l'effet potentiel de l'acide sialique sur la protéolyse de ICAM-1 par HLE, nous avons prétraité rsICAM-1 avec la neuraminidase (NA) de *Vibrio cholerae*, une sialidase, avant de l'exposer à HLE. Des analyses électrophorétiques de type SDS-PAGE ont confirmé l'enlèvement du moins partiel des résidus d'acides sialiques de rsICAM-1 puisqu'une bande de plus faible masse moléculaire (~70 kDa) est apparue à la suite du traitement de rsICAM-1 avec la NA (**Fig. 17**). Ces formes prétraitées avec la NA ont semblé plus difficilement protéolysable par HLE. En effet, après 4 h d'incubation avec HLE, des analyses densitométriques ont révélé que rsICAM-1 prétraitée avec la NA avait

seulement été digérée par HLE à 28 % par rapport à 65 % pour rsICAM-1 non-prétraitée avec la NA. Ces résultats indiquent donc que la présence d'acides sialiques à la surface de rsICAM-1 favorise légèrement sa protéolyse par HLE. Ces données corroborent celles de Remold-O'Donnell et Parent (1995) sur l'effet potentialisateur des résidus d'acides sialiques de CD43 sur sa protéolyse par HLE. De plus, ces résultats peuvent expliquer pourquoi les formes glycosylées de rsICAM-1 étaient légèrement plus facilement protéolysable par HLE que les formes déglycosylées puisque les formes déglycosylées ne possédaient plus d'acide sialique à leur surface.

Figure 15: Protéolyse de rsICAM-1 par HLE.

rsICAM-1 (5 μ g) a été incubée pendant 1 h à 37°C avec différentes quantités de HLE (0,04; 0,2 et 1 μ g). Les échantillons ont ensuite été analysés par électrophorèse de type SDS-PAGE (10%) en condition réductrice. Les protéines ont été colorées avec le bleu de Coomassie (M; marqueurs de masse moléculaire, BSA; albumine de sérum bovin). Les résultats sont représentatifs de plus de cinq expériences indépendantes.

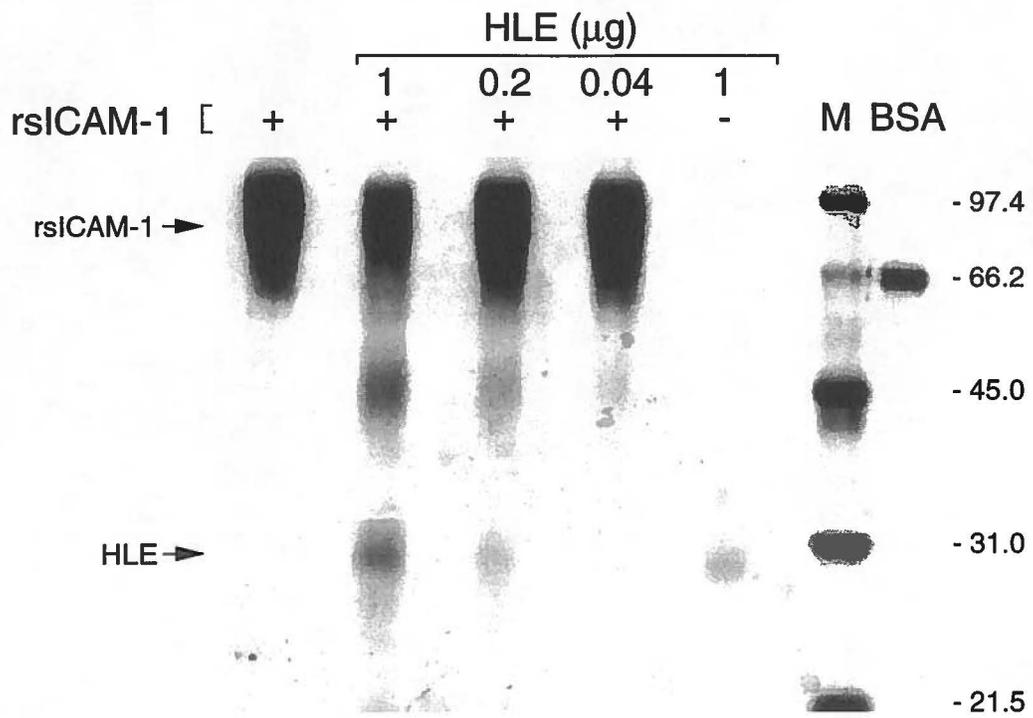


Figure 16: Effet de la N-glycosylation sur la sensibilité de rsICAM-1 au clivage par HLE.

rsICAM-1 (1 μ g) a été incubée pendant 20 h à 37°C avec ou sans N-glycosidase F (80 U/ml). Un traitement avec HLE (0,1 μ g) a ensuite été effectué pendant 1 h ou 4 h à 37°C. A) Les échantillons ont ensuite été analysés par électrophorèse de type SDS-PAGE (15%) en condition réductrice. Les protéines ont été colorées avec le colorant SYPRO-RED puis visualisées sous rayonnement UV. L'échantillon qui contenait uniquement HLE a été incubé pendant 4 h. Les marqueurs (M) de masse moléculaire apparaissent à droite du gel. B) Une amplification non-linéaire a été effectuée au niveau de la partie inférieure du gel afin de visualiser clairement les fragments de faible masse moléculaire générés par le clivage de rsICAM-1. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

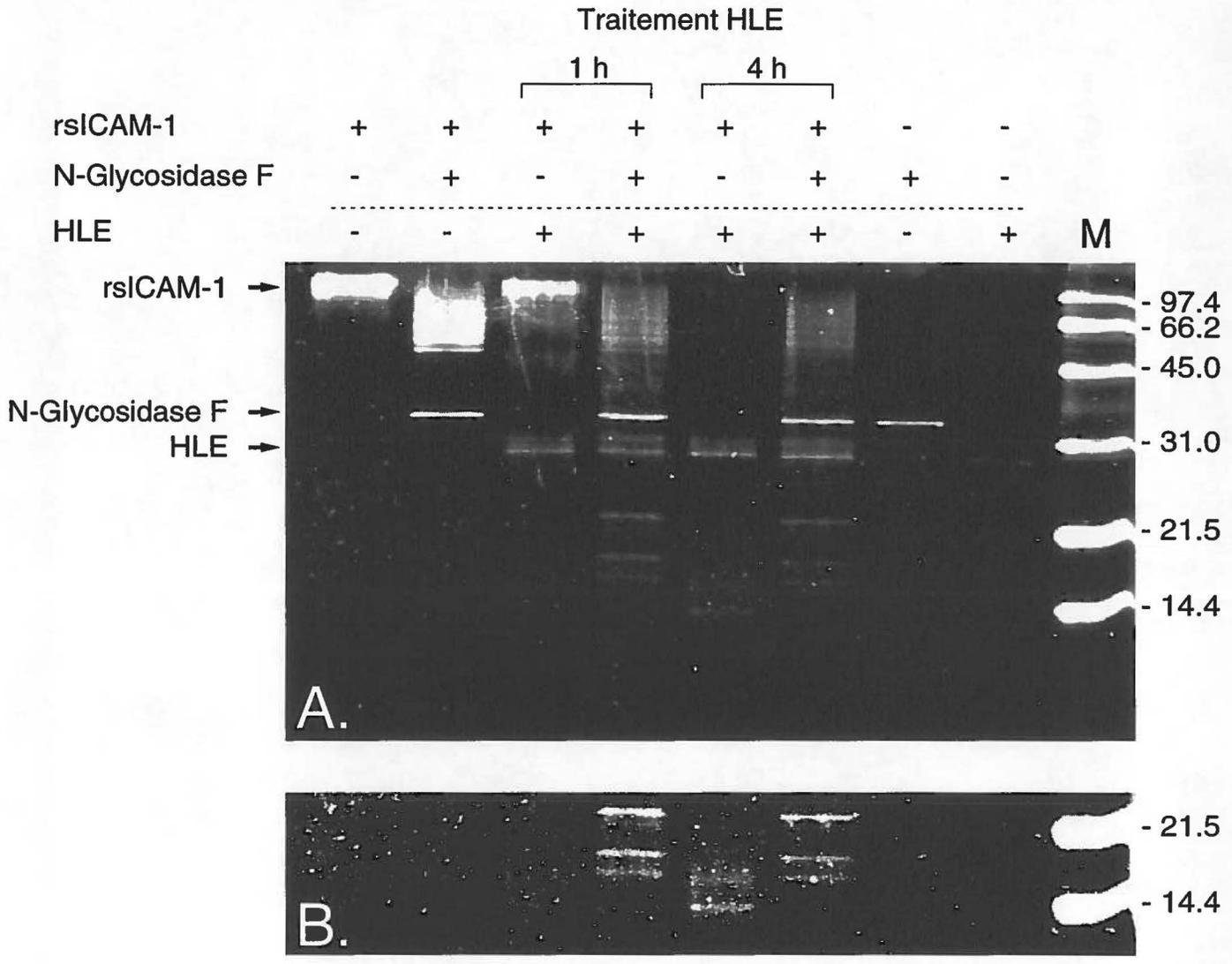
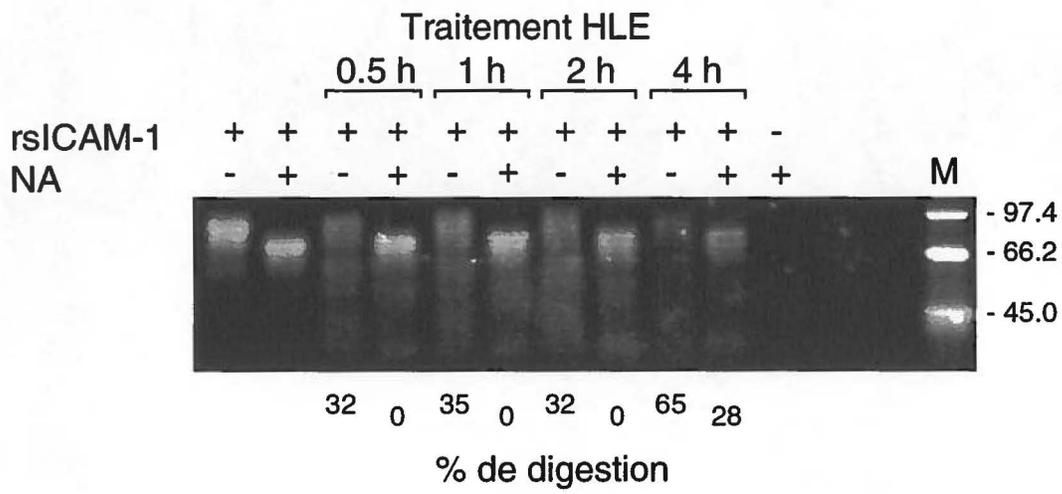


Figure 17: Effet de l'acide sialique sur le clivage de rsICAM-1 par HLE.

rsICAM-1 (1 µg) a été incubée pendant 1 h à 37°C avec ou sans neuraminidase de *Vibrio cholerae* (0,4 U/mL). Un traitement HLE (0,1 µg) a ensuite été effectué pendant différents temps (0,5 h à 4 h) à 37°C. Les échantillons ont ensuite été analysés par électrophorèse de type SDS-PAGE (15%) en condition réductrice. Les protéines ont été colorées avec le colorant SYPRO-RED puis visualisées sous rayonnement UV. Les marqueurs (M) de masse moléculaire apparaissent à droite du gel. L'intensité des signaux (bandes) a été déterminée par densitométrie et les pourcentage de digestion établis selon les valeurs obtenues en absence de HLE. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.



3.0 RÉSULTATS OBTENUS AVEC DES FLUIDES DE LAVAGES BRONCHOALVÉOLAIRES (BAL) DE PATIENTS ATTEINTS DE FIBROSE KYSTIQUE (FK)

Afin de déterminer la pertinence biologique du clivage de ICAM-1 par HLE, des échantillons de lavages de sécrétions bronchoalvéolaires provenant d'individus atteints de FK et contenant des concentrations élevées de HLE ont été utilisés (McElvaney *et al.*, 1991). Les concentrations de HLE mesurées dans ces liquides biologiques (>200µg/mL) sont théoriquement suffisantes pour induire la protéolyse de ICAM-1 puisque, selon nos précédents résultats, des concentrations supérieures ou égales à 20 µg par mL de HLE purifiée peuvent induire la protéolyse membranaire de ICAM-1 *in vitro*. Des échantillons de liquides BAL obtenus de six patients atteints de FK à différents stades cliniques ont été utilisés. Dans un premier temps, l'activité HLE nette de ces liquides a été mesurée. Dans un deuxième temps, nous avons évalué la capacité de l'activité protéolytique des liquides BAL à induire le clivage de ICAM-1.

3.1 Mesure de l'activité HLE contenue dans des échantillons de fluides bronchoalvéolaires

Pour mesurer l'activité protéolytique de HLE contenue dans les six échantillons de liquides BAL, un substrat colorimétrique et spécifique, le N-Méthoxysuccinyl-Ala-Ala-Pro-Val-Nitroanilide, a été utilisé (Nakajima *et al.*, 1979). Ce substrat peptidique est couramment utilisé pour doser spécifiquement par spectrophotométrie l'activité HLE dans divers liquides biologiques. Nos analyses ont démontré que les six échantillons de liquides BAL contenaient tous d'importantes concentrations de HLE; des concentrations de 341 µg par mL (+/- 211) ont été détectées en moyenne dans les six échantillons (**Fig. 18**). Ces concentrations de HLE ont été déterminées en fonction d'une courbe standard obtenue à l'aide de différentes concentrations de HLE purifiée de source commerciale; la linéarité de la courbe obtenue indique une vitesse de dégradation constante du substrat peptidique qui était directement proportionnelle à la concentration en HLE.

3.2 Inhibition de la protéolyse membranaire de ICAM-1 et de CD4 par des fluides BAL de patients atteints de FK en présence d'inhibiteurs de HLE

Après avoir détecté d'importantes quantités de HLE dans les six échantillons de fluides BAL, nous avons incubé les cellules U-937 en présence de ces différents liquides biologiques afin d'évaluer leur capacité respective à induire la protéolyse membranaire de ICAM-1 et de CD4 *ex vivo*. Pour ce faire, les cellules ont été incubées pendant 2 h à

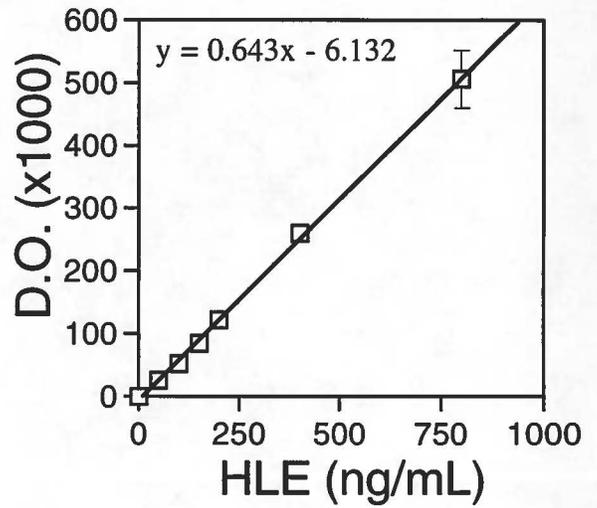
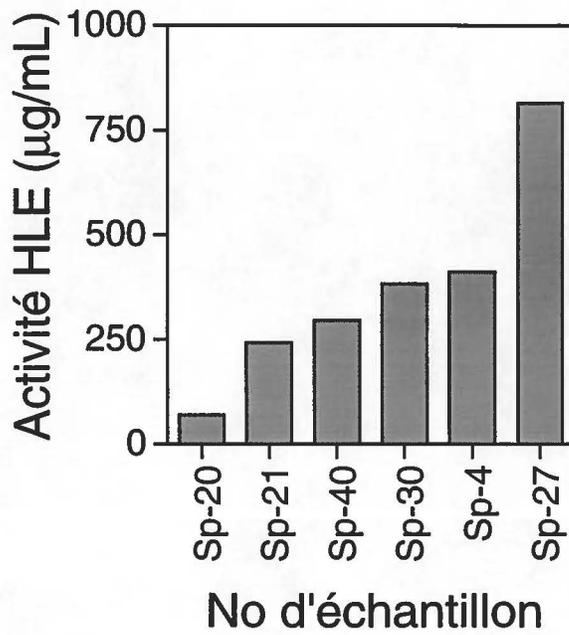
37°C en présence ou en absence de liquides BAL (dilués 1:4 ou 1:40) pour ensuite évaluer l'expression membranaire de ICAM-1 et de CD4 par cytofluométrie à l'aide d'AcM contre ICAM-1 (RR1/1) et CD4 (MT-310). Deux concentrations de HLE purifiée (20 et 40 µg/mL) ont également été utilisées à titre de témoins positifs. De plus, l'inhibiteur peptidique spécifique à HLE (MSAAPVCK) a été utilisé afin d'inhiber spécifiquement l'activité HLE contenues dans les liquides BAL; une concentration de 10mM de MSAAPVCK a été utilisé puisque des concentrations supérieures ou égales à 2mM se sont avérées nécessaires pour inhiber complètement l'activité catalytique de 20 µg par mL de HLE purifiée. Nos résultats montrent que la plupart des échantillons de liquides BAL ont induit des baisses significatives d'expression de ICAM-1 et de CD4 et ce, même après dilution 1:40 du liquide (**Fig. 19A**); l'intensité des baisses d'expression obtenues pour ICAM-1 et CD4 corrélait avec le degré d'activité HLE des fluides BAL. À de fortes concentrations, un clivage protéolytique pratiquement complet de ICAM-1 (i.e. >90%) et de CD4 (i.e. >95%) a été observé pour chacun des six échantillons (résultats non-montrés). Cette protéolyse membranaire de ICAM-1 et de CD4 qui a été observée pour chacun de ces différents échantillons biologiques dépendait spécifiquement de leur activité HLE respective puisque l'addition d'un inhibiteur peptidique HLE-spécifique (MSAAPVCK) a pu inhiber complètement les baisses d'expression de ICAM-1 et de CD4 (**Fig. 19A**). Fait intéressant, la sensibilité de ICAM-1 au clivage protéolytique par HLE était similaire à celle de CD4, récemment identifié comme étant un substrat de HLE (Döring *et al.*, 1995). Dans d'autres expériences, MSAAPVCK a été remplacé par α 1-AT (200 µg/mL), le principal inhibiteur naturel de HLE retrouvé dans le plasma sanguin; tout comme MSAAPVCK, α 1-AT a également été capable d'inhiber la protéolyse de ICAM-1 et de CD4 (**Fig. 19B**). Ces résultats démontrent que des concentrations suffisamment élevées de HLE sont présentes dans les fluides BAL de patients atteints de FK pour induire rapidement des baisses d'expression membranaire de ICAM-1 et de CD4.

Figure 18: Mesure de l'activité HLE contenue dans des liquides BAL provenant de patients atteints de FK.

A) Activité HLE contenue dans les six échantillons de liquides BAL (à gauche). Ces concentrations de HLE ont été déterminées en fonction d'une courbe standard (à droite) qui a été obtenue en incubant différentes concentrations de HLE purifiée avec une concentration fixe du substrat colorimétrique Meo-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-NA. L'hydrolyse du substrat HLE-spécifique a été mesurée par spectrophométrie à 410 nm.

B) Tableau clinique des six patients atteints de FK montrant en parallèle l'activité HLE des liquides BAL.

A.

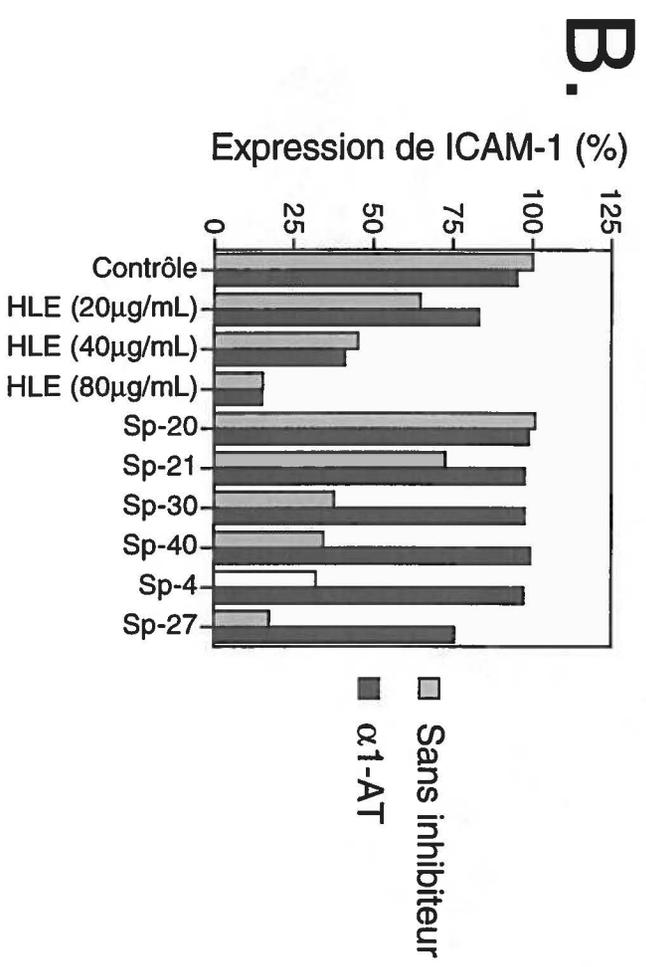
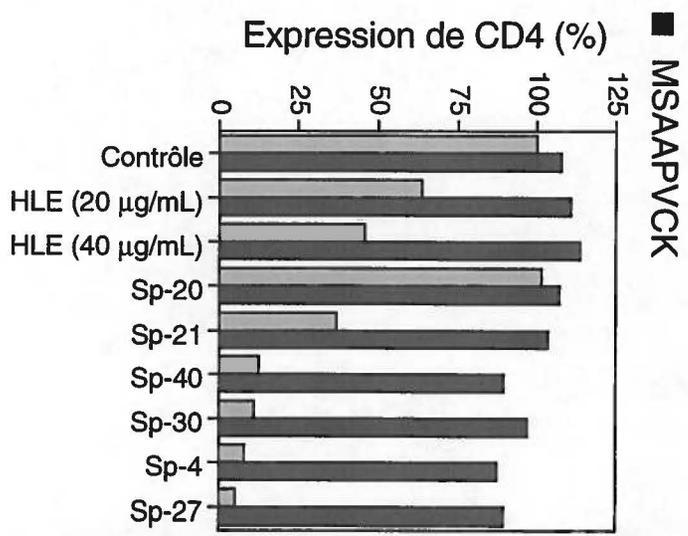
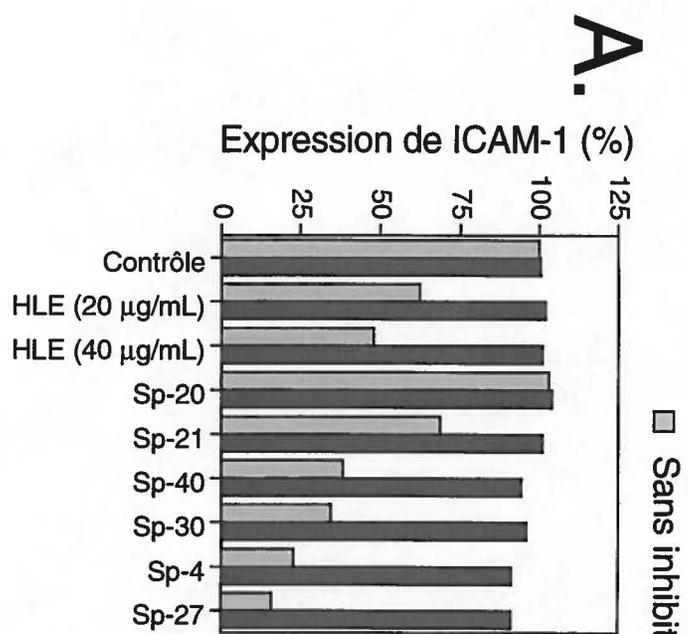


B.

No de patient	Clinique	HLE (µg/mL)
20	Atteinte légère	70
21	Atteinte légère	243
40	Atteinte modérée	296
30	Décédée	381
4	Décédée	411
27	À la limite de l'insuffisance respiratoire	816
<i>Moyenne</i>		<i>369 +/- 211</i>

Figure 19: Inhibition de la protéolyse membranaire de ICAM-1 et de CD4 dans des liquides BAL en présence d'inhibiteurs de HLE.

Des cellules U-937 ont été traitées pendant 2 h à 37°C en présence (20 µg/mL) ou en absence de HLE purifiée ou d'échantillons de liquides BAL qui furent préalablement traités ou non pendant 15 min à 37°C avec (A) MSAAPVCK (10 mM) ou (B) α 1-antitrypsine (200 µg/mL). Les cellules ont ensuite été lavées puis marquées avec les AcM RR1/1 et MT-310 afin d'analyser respectivement l'expression de ICAM-1 et de CD4 par cytofluométrie. Les niveaux d'expression de ICAM-1 et de CD4 sont exprimés en pourcentage et ont été évalués à l'aide de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) mesurée sur 10000 cellules. Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.



DISCUSSION

Dans ce travail, nous avons démontré et caractérisé le clivage protéolytique de ICAM-1 humain par HLE. Premièrement, des études réalisées par cytofluométrie en flux sur différentes lignées cellulaires humaines, ont permis de démontrer un clivage membranaire de ICAM-1 par HLE qui dépendait de la dose HLE utilisée, et qui était complètement inhibé en présence de α 1-AT, le principal inhibiteur plasmatique de HLE. De plus, un AcM (RR1/1) dirigé contre le domaine N-terminal de ICAM-1 (D1) a également inhibé la protéolyse de ICAM-1 par HLE, suggérant la nécessité d'une liaison de HLE à proximité du domaine D1 de ICAM-1. La protéolyse directe de ICAM-1 par HLE a ensuite été confirmée par des études électrophorétiques en utilisant une forme recombinante soluble de ICAM-1 (rsICAM-1). Le clivage ne semble pas être modulé de façon significative par les modifications post-traductionnelle de ICAM-1. Finalement, nous avons montré que l'activité HLE retrouvée *in vivo* dans des liquides BAL de patients atteints de FK étaient suffisamment importante pour induire la protéolyse membranaire de ICAM-1 de la surface cellulaire puisque l'ajout de α 1-AT ou d'un inhibiteur peptidique et spécifique envers le site catalytique de HLE (MSAAPVCK) a complètement inhibé la protéolyse de ICAM-1.

1.1 Protéolyse partielle ou complète de ICAM-1 et conséquences fonctionnelles

Les résultats sur la protéolyse de ICAM-1 par HLE que nous avons obtenus par cytofluométrie à l'aide d'AcM contre ICAM-1 étaient des mesures indirectes de la protéolyse complète de la partie extracellulaire de ICAM-1, composée de cinq domaines d'Ig (D1-D5), puisque l'incapacité d'un anti-ICAM-1 de pouvoir se lier à la suite d'un traitement HLE peut indiquer uniquement la perte de la partie N-terminal rattachée depuis l'épitope reconnu par l'AcM en question sans nécessairement indiquer le clivage de d'autres épitopes localisés vers l'extrémité C-terminal. La protéolyse de ICAM-1 par HLE aurait pu être partielle et entraîner la perte de quelques domaines N-terminal seulement (e.g. D1 et D2), n'affectant possiblement pas la fonctionnalité des autres domaines restants (e.g. D3, D4 et D5). Par exemple, dans le cas de CD4 et de CD43, il a été démontré que ces deux molécules étaient partiellement protéolysées par HLE. Des AcM de spécificités différentes envers les quatre domaines extracellulaires de CD4 (D1-D4) ont en effet révélé que le domaine D4 (membrane-basale) n'était pas protéolysé par HLE contrairement à D1 et D2 (Döring *et al.*, 1995). Une étude par immunoprécipitation avec de l'anti-CD43 a également démontré que la partie extracellulaire N-terminale de CD43 n'était que partiellement digérée (~40%) par HLE (Remold-O'Donnell et Parent, 1995).

Dans cette présente étude, nous avons utilisé deux AcM contre ICAM-1 humain: B-H17 et RR1/1. L'épitope reconnu par B-H17 n'a présentement pas été identifié, alors que celui de RR1/1 est localisé au niveau du domaine N-terminal de ICAM-1 (i.e. D1). Ainsi, la baisse d'immunomarquage de ICAM-1 que nous avons observé avec RR1/1 à la suite d'un traitement HLE, indique possiblement la délétion complète du domaine D1 de ICAM-1, ou d'un épitope conformationnel proximal. Puisque D1 contient l'épitope de liaison envers LFA-1 (Staunton *et al.*, 1990), il apparaît donc concevable que des interactions cellule-cellule LFA-1/ICAM-1 dépendantes seraient alors affectées négativement à la suite d'une protéolyse, complète ou partielle, de ICAM-1 par HLE, d'autant plus que l'AcM RR1/1 bloque la liaison de ICAM-1 à LFA-1. Ce même domaine, qui contient également un site de liaison envers le fibrinogène soluble est également utilisé comme site d'ancrage par certains microorganismes, tels que les rhinovirus et le protozoaire *Plasmodium falciparum*, l'agent étiologique de la malaria. Tout comme LFA-1, la liaison de ces trois autres ligands envers le domaine D1 de ICAM-1 serait donc affectée à la suite d'une protéolyse de ICAM-1 par HLE. Étant donné que nos analyses effectuées *in vitro* avec une forme recombinante soluble de ICAM-1 (rsICAM-1) ont révélé que HLE pouvait en effectuer la protéolyse complète en fragmentant rsICAM-1 à de multiples endroits, il apparaît aussi concevable que la liaison de Mac-1 à ICAM-1 via le domaine D3 serait affectée à la suite d'une protéolyse membranaire de ICAM-1 par HLE. L'observation que le clivage de rsICAM-1 par HLE génère en premier lieu l'apparition d'un fragment de 45 kDa, correspondant approximativement à la masse moléculaire de deux ou trois domaines d'Ig (~15-20 kDa par domaine), supporte cette hypothèse. Cependant, cette possibilité doit être considérée avec prudence puisque la protéolyse *in vitro* de rsICAM-1 en plusieurs fragments ne reflète pas nécessairement les mêmes conditions environnementales que celles retrouvées à la surface cellulaire pour la forme transmembranaire de ICAM-1; cette dernière est en effet enchâssée conjointement avec d'autres Ag de surface qui pourraient interférer par encombrement stérique au niveau de sa protéolyse et, par conséquent, empêcher sa protéolyse complète par HLE. Ceci pourrait donc ne pas entraîner la perte du domaine D3 de ICAM-1 et ainsi ne pas affecter les interactions ICAM-1/Mac-1 dépendantes. La délétion du domaine D3 pourrait être vérifiée à l'aide d'éventuels AcM dirigés contre les domaines membrane-basale de ICAM-1 (i.e. D4 et D5) mais non disponibles présentement. Une immunoprécipitation de ICAM-1 effectuée conjointement avec des tests d'adhésion cellulaire Mac-1/ICAM-1 dépendants pourraient également être envisagée comme alternative afin d'évaluer la protéolyse de D3 par HLE.

1.2 Facteurs intrinsèques et extrinsèques pouvant affecter la protéolyse de ICAM-1

Des études ont montré que les molécules ICAM-1 pouvaient subir de nombreuses modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles entraînant une importante diversité moléculaire (isoformes) chez certains types cellulaires. Certaines de ces isoformes pourraient alors présenter des structures plus ou moins difficilement protéolysable par HLE. Ainsi, la capacité de ICAM-1 à former des homodimères (Reilly *et al.*, 1995), l'expression d'isoformes résultant d'un épissage alternatif (King *et al.*, 1995), et la présence de différents patrons de glycosylation (Diamond *et al.*, 1991; Bloom *et al.*, 1996) pourraient tous être des facteurs intrinsèques à ICAM-1 capables théoriquement d'affecter sa protéolyse par HLE. De plus, certains facteurs extrinsèques comme l'hétéropolymérisation de ICAM-1 avec d'autres molécules, l'expression d'inhibiteurs de protéases membranaires contre HLE, l'expression de récepteurs HLE (e.g. Mac-1), et la présence de substrats HLE autres que ICAM-1 (e.g. CD43) pourraient également limiter l'efficacité du clivage membranaire de ICAM-1. Ces facteurs intrinsèques et extrinsèques pourraient expliquer le phénomène de résistance de ICAM-1 à la protéolyse par HLE que nous avons observé sur les cellules THP-1. Des expériences étudiant l'effet de la confluence cellulaire sur la sensibilité de ICAM-1 à la protéolyse par HLE pourraient s'avérer intéressantes puisque, selon des résultats obtenues par notre groupe de recherche (Pierre-Olivier Estève *et al.*, communications personnelles), la confluence cellulaire peut induire la sécrétion de protéases chez certains types cellulaires; les cellules sécrétrices de protéases pourraient donc acquérir une certaine résistance envers leur propre activité protéolytique en exprimant et/ou en sécrétant des inhibiteurs de protéases. Les monocytes ont été rapportés comme étant des producteurs de α 1-AT, le principal inhibiteur de HLE (Roberts *et al.*, 1995). Ceux-ci peuvent également exprimer et sécréter des quantités appréciables de HLE (Campbell *et al.*, 1989). Il est donc possible que le phénomène transitoire de résistance de ICAM-1 à la protéolyse par HLE que nous avons observé sur THP-1 était principalement dû à l'expression d'inhibiteurs protéolytiques tel α 1-AT. Alternativement, ce phénomène de résistance pourrait également être expliqué par l'expression de récepteurs HLE qui auraient pu affecter la protéolyse de ICAM-1. De tels récepteurs ont été rapporté à la surface des leucocytes; l'intégrine- β 2 Mac-1 (Cai et Wright, 1996) en est un exemple. L'expression transitoire de Mac-1 à la surface de THP-1 aurait donc pu affecter la protéolyse de ICAM-1. Par ailleurs, l'homodimérisation de ICAM-1 à la surface de THP-1 pourrait également être un autre facteur susceptible d'affecter sa protéolyse par HLE puisque l'enlacement de deux

molécules ICAM-1 pourrait camoufler certains sites préférentiels de clivage. L'analyse de cette possibilité nécessiterait donc la purification des monomères et homodimères de ICAM-1 tels que précédemment rapporté par Reilly *et al.* (1995).

Nous avons étudié l'effet de la glycosylation sur la protéolyse de ICAM-1 par HLE étant donné que: 1) l'affinité de Mac-1 envers ICAM-1 est régulée par la glycosylation du domaine D3 de ICAM-1 (Diamond *et al.*, 1991), et 2) les molécules ICAM-1 sont glycosylées de façon hétérogène chez certains types cellulaires (Dustin *et al.*, 1986, Rothlein *et al.*, 1986, Staunton *et al.*, 1988). Les oligosaccharides de ICAM-1 pourraient ainsi jouer un rôle important au niveau de la sensibilité de ICAM-1 envers HLE en camouflant, par exemple, certains sites préférentiels de clivage. Puisque D1 et D5 ne présentent aucun site de glycosylation, on pourrait donc s'attendre à ce que ces deux domaines extracellulaires soient davantage susceptibles à l'activité catalytique de HLE par rapport aux autres domaines, c'est-à-dire, D2, D3, et D4 qui possèdent de nombreux oligosaccharides à leur surface. Fait surprenant, nos expériences effectuées *in vitro* n'ont pu démontrer une sensibilité accrue de rsICAM-1 à HLE suite à une déglycosylation différentielle de rsICAM-1 par une N-glycosidase. Cependant, étant donné que ces expériences ne simulaient pas nécessairement une glycosylation différentielle naturelle comme celle qui est retrouvée chez certains types cellulaires, d'autres expériences utilisant des molécules ICAM-1 purifiées à partir de cellules exprimant des patrons distincts de glycosylation devront donc être effectuées afin d'étudier la question dans un contexte plus physiologique.

1.3 Signification biologique du clivage membranaire de ICAM-1 par HLE

ICAM-1 joue un rôle clé dans le développement de la réponse immunitaire en participant, entre autre, au mécanisme d'adhésion ferme des PMN et des lymphocytes à l'endothélium vasculaire. Malgré la présence des importantes concentrations d'inhibiteurs de protéases qui sont retrouvées *in vivo*, particulièrement dans des conditions intravasculaires, la protéolyse de ICAM-1 par HLE à la suite d'une libération contrôlée de HLE par les PMN pourrait théoriquement s'effectuer dans certaines conditions particulières. Puisque l'activité protéolytique nette est principalement déterminée par un ratio enzyme:inhibiteur élevé (>1), une libération massive de HLE au niveau extracellulaire à la suite d'une exocytose granulaire pourrait contrebalancer les concentrations locales d'inhibiteurs de protéases permettant alors une protéolyse de substrats qui s'effectuerait uniquement au niveau de la zone péricellulaire de contact des PMN. Des travaux récents étudiant le

phénomène d'exocytose granulaire des PMN ont en effet démontré *in vitro* que ce processus de protéolyse péricellulaire s'effectuait malgré la présence de concentrations physiologiques d'inhibiteurs de protéases (Liou et Campbell, 1996). D'ailleurs, on pourrait également penser que cette protéolyse extracellulaire pourrait uniquement être polarisée au niveau de la zone de contact PMN-cellule endothéliale puisqu'une réorientation complète du centre organisateur des microtubules est observée à la suite d'un contact cellule-cellule permettant de diriger les sécrétions granulaires vers la cellule opposée (Kupfer et Singer, 1989). Ce phénomène de polarisation membranaire est consistant avec celui observé pour les molécules ICAM-1 et Mac-1 dont l'expression est concentrée au niveau de la zone de contact intercellulaire (Sanders *et al.*, 1991, Erlandsen *et al.*, 1993). Des études ont également rapporté que HLE pouvait se retrouver associée de façon non-covalente à la surface des leucocytes (Bristow *et al.*, 1991; Owen *et al.*, 1995). Malgré cette association physique, les formes membranaires préservent leur activité protéolytique. De plus, et fait intéressant, Owen *et al.* (1995) ont remarqué que les formes associées à la membrane cytoplasmique des PMN étaient résistantes aux inhibiteurs naturels de protéases de haute masse moléculaire (e.g. α 1-AT). Ces auteurs ont alors proposé que les formes membranaires de HLE permettraient aux PMN de contrôler et de concentrer l'activité catalytique de HLE à des endroits stratégiques au niveau de leur membrane cytoplasmique, limitant ainsi les dommages tissulaires. Récemment, Cai et Wright (1996) ont montré que Mac-1 (CD11b/CD18) était l'un des récepteurs présents à la surface des PMN qui était capable de lier spécifiquement HLE. Ces derniers ont également montré qu'un AcM contre HLE prévenait le détachement des PMN contre une surface adsorbée de fibrinogène, suggérant un nouveau mécanisme de déadhesion cellulaire probablement utilisé par les PMN afin de réguler, entre autre, l'adhésivité de Mac-1. D'autres études ont également montrées que CD18 (chaîne β 2 de Mac-1 et LFA-1) jouait un rôle important au niveau de la sécrétion de HLE par les PMN: la liaison de sICAM-1 à la surface des PMN, ou encore, le pontage ("cross-linking") de CD18 à l'aide d'AcM a induit des niveaux élevés de sécrétion de HLE (Barnett *et al.*, 1996a, 1996b). Des interactions Mac-1/ICAM-1 entre les PMN et les cellules endothéliales pourraient donc induire la sécrétion de HLE via le "cross-linking" de CD18 afin d'induire le clivage de ICAM-1 (ou autres ligands liés à Mac-1) lorsque des contacts cellulaires ne sont plus requis. De plus, l'association physique de HLE à Mac-1 pourrait potentiellement faciliter la protéolyse de ICAM-1. L'expression extracellulaire de protéases telles HLE pourrait donc constituer un mécanisme général utilisé pour la locomotion et la déadhesion des cellules liées à d'autres cellules et/ou macromolécules de la matrice extracellulaire. Cependant, plusieurs questions demeurent sans réponse à

savoir si l'activité catalytique de HLE est préservée suite à son association avec Mac-1, ou encore, si HLE doit être libérée de Mac-1 pour induire le clivage de ICAM-1 par exemple.

1.4 Implications pathophysiologiques du clivage membranaire de ICAM-1 par HLE

Parmi les maladies inflammatoires dont la pathogenèse est principalement due à un déséquilibre au niveau de la sécrétion et/ou de la régulation de l'activité catalytique de HLE, la FK est de loin celle où un rôle pour HLE a été le mieux documenté. Sa puissante activité catalytique serait, entre autre, responsable de la destruction du parenchyme pulmonaire causant ainsi de sérieux troubles respiratoires, parfois même de l'insuffisance respiratoire. En plus d'affecter l'intégrité tissulaire, HLE interférerait également au niveau de la défense immunitaire en effectuant le clivage des Ig et du récepteur C3b, empêchant l'opsonophagocytose de bactéries pathogènes telle que *Pseudomonas aeruginosa* (McEnaney *et al.*, 1991). Cet état d'immunodéficiência des poumons expliquerait entre autre pourquoi les patients atteints de FK présentent tant d'infections bactériennes chroniques, nécessitant au recours constant de l'antibiothérapie. Nos résultats obtenus sur l'activité catalytique de HLE dans les liquides BAL corroborent ceux obtenus par Döring *et al.* (1995) à propos du clivage de CD4 et de CD8 par HLE, et apportent maintenant des évidences que HLE pourrait également interférer au niveau des interactions cellulaires dans la FK. En effet, puisque les interactions ICAM-1 dépendantes qui s'établissent principalement avec les intégrines $\beta 2$ (LFA-1 et Mac-1) ont été démontrées importantes pour le développement de la réponse immunitaire, le clivage membranaire de ICAM-1 par HLE pourrait expliquer en partie l'anergie observée au niveau des poumons chez les patients atteints de FK. Fait intéressant, sICAM-1 est retrouvée dans les sécrétions BAL de patients atteints de FK (Salva *et al.*, 1996, De Rose *et al.*, 1998). De plus, sICAM-1 est principalement retrouvé chez les individus cliniquement stables alors que durant la phase aiguë de la maladie, les niveaux de sICAM-1 chutent significativement. Étant donné la capacité de HLE de fragmenter sICAM-1 à de multiples endroits, les baisses observées de sICAM-1 durant la phase aiguë de la maladie pourraient donc être dues à une augmentation des concentrations locales de HLE dans les liquides BAL. Dans d'autres situations pathologiques, telle que la péritonite purulente, des concentrations moyennes de HLE de 68 μg par mL ont été rapporté dans l'exudat abdominal (Frohlich *et al.*, 1997). Ces fluides péritonéaux ont également des niveaux anormalement élevés de sICAM-1 qui sont corrélés avec le nombre important de PMN qui sont retrouvés lors des infections épisodiques. Cependant,

étant donné le nombre important de conditions associées avec des taux anormalement élevés de sICAM-1 (Gearing et Newman, 1993), et étant donné la récente découverte d'un ARNm résultant d'un épissage alternatif qui coderait une forme soluble de ICAM-1 (Wakatsuki *et al.*, 1995), il est encore trop tôt pour conclure dans quel mesure l'activité HLE pourrait être responsable de la présence de sICAM-1.

Nous avons observé que HLA-DR, une molécule du CMH-II, était résistante au clivage protéolytique par HLE. Ceci était en partie prévisible puisque les molécules du CMH-II doivent, avant d'être exprimées au niveau de la surface cellulaire, résister à un environnement protéolytique hostile durant leur maturation dans les compartiments endosomaux afin de favoriser la protéolyse des antigènes natifs en peptides antigéniques. Par ailleurs, la sensibilité comparable que nous avons observé pour ICAM-1 et CD4 au niveau de leur protéolyse membranaire par HLE peut être expliquée biochimiquement puisque de nombreuses homologies structurales sont retrouvées entre ICAM-1 et CD4. Ces deux molécules sont en effet des membres de la superfamille des Ig qui possèdent un nombre équivalent de domaines extracellulaires ressemblant aux Ig, c'est-à-dire, quatre pour CD4 (D1-D4) et cinq pour ICAM-1 (D1-D5). De plus, une région charnière (« hinge region »), semblable à celles retrouvées pour les Ig, est retrouvée au centre de ICAM-1 et de CD4. Cette région charnière qui est située entre les domaines D2 et D3 de ICAM-1 et de CD4 accorde une certaine souplesse et flexibilité à la partie extracellulaire N-terminale de ces deux molécules. Or, il a été démontré dans le cas des IgG que les régions charnières étaient plus susceptibles aux attaques protéolytiques par HLE ou par la papaïne (Döring *et al.*, 1986), étant donné que la structure moléculaire de ces régions résulte d'un alignement moins compacte en acides aminées par rapport à ceux retrouvés dans la composition des domaines d'Ig, qui sont majoritairement hydrophobes et dont la structure tertiaire est stabilisée par des ponts disulfures. La susceptibilité accrue des régions charnières à la dégradation enzymatique pourrait donc expliquer pourquoi ICAM-1 et CD4 possèdent une sensibilité comparable envers l'activité catalytique de HLE. Le clivage membranaire de ICAM-1 et de CD4 par HLE affecterait vraisemblablement la reconnaissance des complexes CMH/peptides par les cellules T puisque : 1) ces deux molécules jouent un rôle crucial durant ce processus, et 2) que le clivage de ICAM-1 et de CD4 peut se produire à des concentrations de HLE semblables à la surface de différentes lignées de lymphocytes T humains (e.g. MT-2 et MT-4). De plus, il demeure possible que le clivage de d'autres molécules accessoires (e.g. récepteurs de cytokines et cytokines) pourrait également affecter la transmission de d'autres signaux co-accessoires, nécessaires à l'activation des cellules T. La possibilité que le clivage protéolytique de ces

molécules accessoires entraînerait un état d'anergie chez les lymphocytes de patients atteints de FK est présentement à l'étude dans notre laboratoire.

CONCLUSION

Globalement, nous avons montré que ICAM-1 était sensible à l'activité catalytique de HLE, une sérine protéase qui est exprimée de façon ubiquitaire chez les leucocytes. Puisque l'intégrine β 2-intégrine Mac-1 est capable de lier spécifiquement HLE et que la sécrétions de HLE par les PMN semble être régulé par β 2, nos résultats suggèrent que les interactions Mac-1/ICAM-1 dépendantes pourraient être régulées et abrogées par des événement protéolytiques HLE-spécifiques. Ce processus de régulation pourrait jouer un rôle important dans les phénomène impliquant des interactions cellulaires comme l'extravasation et l'activation des leucocytes. Le clivage de CD4, de CD8, et de ICAM-1 par HLE, est vraisemblablement suffisant pour expliquer en partie les désordres immuno-inflammatoires qui sont retrouvés dans la FK. Nos résultats permettront de mieux comprendre les anomalies du système immunitaire qui sont rencontrées dans la FK ainsi que dans d'autres maladies infectieuses des voies respiratoires telles que l'emphysème pulmonaire et les bronchites chroniques, où HLE est également retrouvée en importante quantité dans les sécrétions BAL. Ces données pourraient donc soutenir de nouvelles approches thérapeutiques visant à contrer la surproduction de HLE.

L'originalité de ces travaux tient également du fait que: 1) La protéolyse de ICAM-1 était envisagée depuis la découverte des formes solubles de ICAM-1; cependant, aucune protéase n'avait présentement été rapportée comme étant capable d'en effectuer la protéolyse; 2) Bien que nous n'ayons pas montré que HLE soit en partie responsable de la production de sICAM-1, nous avons apporté des évidences directes que la protéolyse membranaire de ICAM-1 par HLE pourrait effectivement se produire *in vivo* dans un contexte pathophysiologique comme la FK, et par conséquent, avoir d'importantes répercussions au niveau des interactions intercellulaires puisque ICAM-1 joue un rôle clé dans le développement de la réponse immunitaire et inflammatoire; 3) Cette étude pourra également ouvrir la voie à d'autres travaux étudiant la protéolyse membranaire de d'autres antigènes de surfaces; 4) Même s'il adviendrait que HLE ne soit pas l'une des protéases « physiologiquement » responsables de la production de sICAM-1, ces travaux pourront servir de base d'étude pour l'investigation de d'autres protéases endogènes susceptibles d'en être responsables.

Dans le futur, des tests fonctionnels d'adhésion cellulaire devront être mis au point afin de montrer que les interactions LFA-1/ICAM-1 et Mac-1/ICAM-1 dépendantes sont affectées à la suite d'une protéolyse de ICAM-1 par HLE. Par ailleurs, la sensibilité de chacune des six isoformes murines de ICAM-1 pourrait également être envisagée puisque

certaines de ces isoformes présentent des structures beaucoup plus compactes, et donc possiblement plus résistantes à la protéolyse par HLE.

REMERCIEMENTS

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr Yves St-Pierre, pour son encadrement et ses nombreux encouragements.

Je remercie également Doris Legault pour son assistance technique, Marcel DesRosiers pour ses nombreux conseils, son expertise et sa passion pour la cytofluométrie en flux, ainsi que tous les membres du laboratoire qui ont participé de près ou de loin à ce projet de recherche, plus particulièrement le Dr Pierre Tremblay, Pierre-Olivier Estève et le Dr Fawzi Aoudjit.

Je remercie le Dr André Cantin M.D. du Centre de recherche en Pneumologie de l'Université de Sherbrooke pour nous avoir fourni les échantillons de lavage broncho-alvéolaire de patients atteints de fibrose kystique.

Enfin, je remercie le FCAR pour son soutien financier durant toute la durée de mes études de maîtrise.

BIBLIOGRAPHIE

- Altieri, D.C., Duperray, A., Plescia, J., Thornton, G.B., Languino, L.R. 1995. Structural recognition of a novel fibrinogen γ chain sequence (117-133) by intercellular adhesion molecule-1 mediates leukocyte-endothelium interaction. *J Biol Chem* **270**:696-699.
- Altieri, D.C., Edgington, T.S. 1988. The saturable high affinity association of factor X to ADP-stimulated monocytes defines a novel function of the Mac-1 receptor. *J Biol Chem* **263**:7007-7015.
- Altmann, D.M., Hogg, N., Trowsdale, J., Wilkinson, D. 1989. Cotransfection of ICAM-1 and HLA-DR reconstitutes human antigen-presenting cell function in mouse L cells. *Nature* **338**:512-514.
- Arkin, S., Naprstek, B., Guarini, L., Ferrone, S., Lipton, J.M. 1991. Expression of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) on hematopoietic progenitors. *Blood* **77**:948-953.
- Bagnasco, M., Pesce, G., Pronzato, C., Canonica, G.W. 1990. Functional involvement of the LFA-1/ICAM-1 adhesion system in the autologous mixed lymphocyte reaction. *Cell Immunol* **128**:363-369.
- Bailly, P., Hermand, P., Callebaut, I., Sonneborn, H.H., Khamlichi, S., Mornon, J.P., Cartron, J.P. 1994. The LW blood group glycoprotein is homologous to intercellular adhesion molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**:5306-5312.
- Bailly, P., Tontti, E., Hermand, P., Carton, J.-P., Gahmberg, C.G. 1995. The red cell LW blood group protein is an intercellular adhesion molecule which binds to CD11/CD18 leukocyte integrins. *Eur J Immunol* **25**:3316-3324.
- Banda, M.J., Rice, A.G., Griffin, G.L. et Senior, R.M. 1988. The inhibitory complex of human alpha 1-proteinase inhibitor and human leukocyte elastase is a neutrophil chemoattractant. *J Exp Med* **167**: 1608-1615.
- Barnett, C.C., Moore, E.E., Moore, F.A., Carl, V.S., Biffl, W.L. 1996. Soluble ICAM-1 (sICAM-1) provokes PMN elastase release. *J Surg Res* **63**:6-10.
- Barnett, C.C., Moore, E.E., Moore, F.A., Carl, V.S., Biffl, W.L., Partrick D.A. 1996. Soluble intercellular adhesion molecule-1 provokes polymorphonuclear leukocyte elastase release by CD18. *Surgery* **120**:395-402.
- Bazil, V. 1995. Physiological enzymatic cleavage of leukocyte membrane molecules. *Immunol Today* **16**:135-140.
- Beekhuizen, H., Verdegaal, E.M.E., Blokland, I., van Furth, R. 1992. Contribution of ICAM-1 and VCAM-1 to the morphological changes in monocytes bound to human venous endothelial cells stimulated with recombinant interleukin-4 (rIL-4) or rIL-1 α . *Immunology* **77** : 469-472.

- Berendt, A.R., Simmons, D.L., Tansey, J., Newbold, C.I., Marsh, K. 1989. Intercellular adhesion molecule-1 is an endothelial cell adhesion receptor for *Plasmodium falciparum*. *Nature* **341**:57-59.
- Berendt, A.R., McDowall, A., Craig, A.G., Bates, P.A., Sternberg, M.J.E., Marsh, K., Newbold, C.I., Hogg, N. 1992. The binding site on ICAM-1 for *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes overlaps, but is distinct from, the LFA-1-binding site. *Cell* **68**:71-81.
- Bloom, J.W., Madanat, M.S., Ray, M.K. 1996. Cell line and site specific comparative analysis of the N-linked oligosaccharides on human ICAM-1des454-532 by electrospray ionization mass spectrometry. *Biochem* **35**:1856-1864.
- Boyd, A.W., Dunn, S.M., Secondo, J.V., Culvenor, J.G., Dührsen, U., Burns, G.F., Wayryk, S.O. 1989. Regulation of expression of a human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) during lymphohematopoietic differentiation. *Blood* **73**:1896-1903.
- Braun, N.J., Bodmer, J.L., Virca, G.D., Metz-Virca, G., Maschler, R., Bieth, J.G., Schnebli, H.P. 1987. Kinetic studies on the interaction of eglin C with human leukocyte elastase and cathepsin G. *Biol Chem Hoppe Seyler* **368**:299-307.
- Bristow, C.L., Lyford, L.K., Stevens, D.P., Flood, P.M. 1991. Elastase is a constituent product of T cells. *Biochim Biophys Res Com* **181**:232-239.
- Buckle, A.M., Hogg, N. 1990. Human memory T cells express intercellular adhesion molecule-1 which can be increased by interleukin 2 and interferon- γ . *Eur J Immunol* **20**:337-341.
- Budnik, A., Grewe, M., Gyufko, K., Krutmann, J. 1996. Analysis of the production of soluble ICAM-1 molecules by human cells. *Exp Hematol* **24**:352-359.
- Butcher, E.C. 1991. Leukocyte-endothelial cell recognition : three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* **67** :1033-1036.
- Cai, T.-Q., Wright, S.D. 1996. Human leukocyte elastase is an endogenous ligand for the integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, α M β 2) and modulates polymorphonuclear leukocyte adhesion. *J Exp Med* **184**:1213-1223.
- Campbell, E.J., Campbell M.A. 1988. Pericellular proteolysis by neutrophils in the presence of proteinase inhibitors: effects of substrate opsonization. *J Cell Biol* **106**:667-676.
- Campbell, E.J., Silverman, E.K., Campbell, M.A. 1989. Elastase and cathepsin G of human monocytes; Quantification of cellular content, release in response to stimuli, and heterogeneity in elastase-mediated proteolytic activity. *J Immunol* **143**:2961-2968.

- Carpén, O., Pallai, P., Staunton, D.E., Springer, T.A. 1992 Association of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) with actin-containing cytoskeleton and α -actinin. *J Cell Biol* **118**:1223-1234.
- Casasnovas, J.M., Springer, T.A. 1995. Kinetics and thermodynamics of virus binding to receptor; Studies with rhinovirus, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and surface plasmon resonance. *J Biol Chem* **270**:13216-13224.
- Casasnovas, J.M., Springer, T.A., Liu, J.-H., Harrison, S.C., Wang, J.-H. 1997. Crystal structure of ICAM-2 reveals a distinctive integrin recognition surface. *Nature* **387**:312-315
- Casasnovas, J.M., Stehle, T., Liu, J.-H., Wang, J.-H., Springer, T.A. 1998. A dimeric crystal structure for the N-terminal two domains of intercellular adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**:4134-4139.
- Clark, E.A., Ledbetter, J.A., Holly, R.C., Dinndorf, P.A., Shu, G. 1986. Polypeptides on human B lymphocytes associated with cell activation. *Hum Immunol* **16**:100-105.
- Cobb, R.R., Dubins, J.S., Warner, J., Molony, L. 1992. Functional expression of soluble ICAM-1 by baculovirus-infected Sf9 cells. *Biochem Biophys Res Commun* **185**:1022-1033.
- Damle, N.K., Klussman, K., Linsley, P.S., Aruffo, A. 1992. Differential costimulatory effects of adhesion molecules B7, ICAM-1, LFA-3, and VCAM-1 on resting and antigen-primed CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol* **148**:1985-1992.
- del Pozo, M.A., Cabanas, C., Montoya, M.C., Ager, A., Sanchez-Mateos, P. and Sanchez-Madrid, F. 1997. ICAMs redistributed by chemokines to cellular uropods as a mechanism for recruitment of T lymphocytes. *J Cell Biol* **137**:493-508.
- del Pozo, M.A., Sanchez-Mateos, P., Nieto, M., Sanchez-Madrid, F. 1995. Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J Cell Biol* **131**:495-508.
- de Rose, V., Oliva, A., Messore, B., Grosso, B., Mollar, C., Pozzi, E. 1998. Circulating adhesion molecules in cystic fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **157**:1234.
- Diamond, M.S., Springer, T.A. 1993. A subpopulation of Mac-1 (CD11b/CD18) molecules mediates neutrophil adhesion to ICAM-1 and fibrinogen. *J Cell Biol* **120**:545-556.
- Diamond, M.S., Staunton, D.E., de Fougerolles, A.R., Stacker, S.A., Garcia-Aguilar, J., Hibbs, M.L., Springer, T.A. 1990. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol* **111**:3129-3139.

- Diamond, M.S., Staunton, D.E., Marlin, S.D., Springer, T.A. 1991. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* **65**:961-971.
- Döring, G. 1994. The role of neutrophil elastase in chronic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med* **150**:S114-S117.
- Döring, G., Frank, F., Boudier, C., Herbert, S., Fleischer, B., Bellon, G. 1995. Cleavage of lymphocyte surface antigens CD2, CD4, and CD8 by polymorphonuclear leukocyte elastase and cathepsin G in patients with cystic fibrosis. *J Immunol* **154**:4842-4850.
- Döring, G., Goldstein, W., Botzenhart, K., Kharazmi, A., Schiötz, P.O., Hoiby, N., Dasgupta, M. 1986. Elastase from polymorphonuclear leucocytes : a regulatory enzyme in immune complex disease. *Clin Exp Immunol* **64** :597-605.
- Dougherty, G.J., Murdoch, S., Hogg, N. 1988. The function of human intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the generation of an immune response. *Eur J Immunol* **18**:35-39.
- D'Souza, S.E., Byers-Ward, V.J., Gardiner, E.E., Wang, H., Sung, S.S. 1996. Identification of an active sequence within the first immunoglobulin domain of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) that interacts with fibrinogen. *J Biol Chem* **271**:24270-24277.
- Duperray, A., Languino, L.R., Plescia, J., McDowall, A., Hogg, N., Craig, A.G., Erendt, A.R., Altieri, D.C. 1997. Molecular identification of a novel fibrinogen binding site on the first domain of ICAM-1 regulating leukocyte-endothelium bridging. *J Biol Chem* **272**:435-441.
- Durieu-Trautmann, O., Chaverot, N., Cazauban, S., Donny, Strosberg, A., Couraud, P.O. 1994. Intercellular adhesion molecule-1 activation induces tyrosine phosphorylation of the cytoskeleton-associated protein cortactin in brain microvessel endothelial cells. *J Biol Chem* **269**:12536-12540.
- Dustin, M.L., Carpen, O., Springer, T.A. 1992. Regulation of locomotion and cell-cell contact area by the LFA-1 and ICAM-1 adhesion receptors. *J Immunol* **148**:2654-2663.
- Dustin, M.L., Rothlein, R., Bhan, A.K., Dinarello, C.A., Springer, T.A. 1986. Induction by IL-1 and interferon- γ : Tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* **137**:245-254.
- Dustin, M.L., Springer, T.A. 1988. Lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) interaction with intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is one of at least three mechanisms for lymphocyte adhesion to cultured endothelial cells. *J Cell Biol* **107** :321-331.

- Ehlers, M.R.W., Riordan, J.F. 1991. Membrane proteins with soluble counterparts: Role of proteolysis in the release of transmembrane proteins. *Biochemistry* **30**:10065-10074.
- Erlandsen, S.L., Hasslen, S.R., Nelson, R.D. 1993. Detection and spatial distribution of the $\beta 2$ integrin (Mac-1) and L-selectin (LECAM-1) adherence receptors on human neutrophils by high-resolution field emission SEM. *J Histochem Cytochem* **41**:327.
- Fawcett, J., Holness, C.L.L., Needham, L.A., Turley, H., Gatter, K.C., Mason, D.Y., Simmons, D.L. 1992. Molecular cloning of ICAM-3, a third ligand for LFA-1, constitutively expressed on resting leukocytes. *Nature* **360**:481-484.
- Fischer, H., Gjørloff, A., Hedlund, G., Hedman, H., Lundgren, E., Kalland, T., Sjögren H.O., Dohlsten, M. 1992. Stimulation of human naive and memory T helper cells with bacterial superantigen. *J Immunol* **148**:1993-1998.
- Fortin, J.-F., Cantin, R., Lamontagne, G., Tremblay, M. 1997. Host-derived ICAM-1 glycoproteins incorporated on human immunodeficiency virus type 1 are biologically active and enhance viral infectivity. *J Virol* **71**:3588-3596.
- Fougerolles, A.R., Springer, T.A. 1992. Intercellular adhesion molecule 3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule 1 on resting lymphocytes. *J Exp Med* **175**:185-190.
- Fouret, P., DuBois, R.M., Bernaudin, J.-F., Takahashi, H., Ferrans, V.J., Crystal, R.G. 1989. Expression of the neutrophil elastase gene during human bone marrow cell differentiation. *J Exp Med* **169**:833-845.
- Frohlich, D., Eiber, R.M., Jochum, M., Billing, A. 1997. Perioperative pattern of peritoneal interleukin 8, tumour necrosis factor- α , and granulocyte elastase release in human secondary peritonitis. *Cytokine* **9**:288.
- Gadek, J.E., Fells, G.A., Wright, D.G., Crystal, R.G. 1980. Human neutrophil elastase functions as a type III collagen "collagenase". *Biochem Biophys Res Commun* **95**:1815-1822.
- Gearing, A.J.H., Newman, W. 1993. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* **14** :506-512.
- Geissler, D., Gaggl, S., Most, J., Greil, R., Herold, M., Dietrich, M. 1990. A monoclonal antibody directed against the human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) modulates the release of tumor necrosis factor- α , interferon- γ and interleukin 1. *Eur J Immunol* **20**:2591-2596.
- Greve, J.M., Davis, G., Meyer, A.M., Forte, C.P., Yost, S.C., Marlor, C.W., Kamarck, M.E., McClelland, A. 1989. The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* **56**:839-847.

- Goldstein, W., Döring, G. 1986. Lysosomal enzymes from polymorphonuclear leukocytes and proteinase inhibitors in patients with cystic fibrosis. *134*:49-56.
- Greenberger, P.A. 1997. Immunologic aspects of lung diseases and cystic fibrosis. *JAMA* **278**:1924-1930.
- Hanasaki, K., Varki, A., Stamenkovich, I., Bevilacqua, M.P. 1994. Cytokine-induced β -galactoside α 2,6-sialyltransferase in human endothelial cells mediates α 2,6-sialylation of adhesion molecules and CD22 ligands. *J Biol Chem* **269**:10637-10643.
- Holland, J., Owens, T. 1997. Signaling through intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) in a B cell lymphoma line; The activation of Lyn tyrosine kinase and the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* **272**:9108-9112.
- Horssen van, M., Loman, S., Rijkers, G.T., Boom, S.E., Bloem, A.C. 1995. Co-ligation of ICAM-1 (CD54) and membrane IgM negatively affects B cell receptor signaling. *Eur J Immunol* **25**:154-158.
- Janoff, A., Feinstein, G., Malemud, C.J., Elias, J.M. 1976. Degradation of cartilage proteoglycan by human leukocyte granule neutral proteases--a model of joint injury. I. Penetration of enzyme into rabbit articular cartilage and release of ³⁵SO₄-labeled material from the tissue. *J Clin Invest* **57**:615-624.
- Jansen, J.H., van der Harst, D., Wientjens G.J.H.M., Kooy-Winkelaar, Y.M.C., Brand, A., Willemze, R., Kluin-Nelemans, H.C. 1992. Induction of CD11a/leukocyte function antigen-1 and CD54/intercellular adhesion molecule-1 on hairy cell leukemia cells is accompanied by enhanced susceptibility to T-cell but not lymphokine-activated killer-cell cytotoxicity. *Blood* **80**:478-483.
- Jenne, D.E. 1994. Structure of the azurocidin, proteinase 3, and neutrophil elastase genes; Implications for inflammation and vasculitis. *Am J Respir Crit Care Med* **150**:S147-S154.
- Kafienah, W., Buttle, D.J., Burnett, D., Hollander, A.P. 1998. Cleavage of native type I collagen by human neutrophil elastase. *Biochem J* **330**:897-902.
- King, P.D., Sandberg, E.T., Selvakumar, A., Fang, P., Beaudet, A.L., Dupont, B. Novel isoforms of murine intercellular adhesion molecule-1 generated by alternative RNA splicing. *J Immunol* **154**:6080-6093.
- Kita, Y., Takashi, T., Iigo, Y., Tamatani, T., Miyasaki, M., Horiuchi, T. 1992. Sequence and expression of rat ICAM-1. *Biochim Biophys Acta* **1131**:108-110.
- Kupfer, A., Singer, S.J. 1989. Cell biology of cytotoxic and helper T cell functions: immunofluorescence microscopic studies of single cells and cell couples. *Annu Rev Immunol* **7**:309.

- Languino, L.R., Duperray, A., Joganic, K.J., Fornaro, M., Thornton, G.B., Altieri, D.C. 1995. Regulation of leukocyte-endothelium interaction and leukocyte transendothelial migration by intercellular adhesion molecule 1-fibrinogen recognition. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**:1505-1509.
- Languino, L.R., Plescia, J., Duperray, A., Brian, A.A., Plow, E.F., Geltosky, J.E., Altieri, D.C. 1993. Fibrinogen mediates leukocyte adhesion to vascular endothelium through an ICAM-1-dependent pathway. *Cell* **73**:1423-1434.
- Leavell, K.J., Peterson, M.W., Gross, T.J. 1997. Human neutrophil elastase abolishes interleukin-8 chemotactic activity. *J Leukoc Biol* **61**:361-366.
- Liou, T.G., Campbell, E.J. 1995. Nonisotropic enzyme-inhibitor interactions: A novel nonoxidative mechanism for quantum proteolysis by human neutrophils. *Biochem* **34**:16171-16177.
- Liou, T.G., Campbell, E.J. 1996. Quantum proteolysis resulting from release of single granules by human neutrophils. *J Immunol* **157**:2624-2631.
- Lo, S.K., Detmers, P.A., Levin, S.M., Wright, S.D. 1989. Transient adhesion of neutrophils to endothelium. *J Exp Med* **169**:1779-1793.
- Lub, M., van Kooyk, Y., Figdor, C.G. 1996. Competition between lymphocyte function-associated antigen 1 (CD11a/CD18) and Mac-1 (CD11b/CD18) for binding to intercellular adhesion molecule-1 (CD54). *J Leukoc Biol* **59**:648-655.
- Lungarella, G.R., Menegazzi, C., Gardi, P., Spessoto, M., Margherita de Santi, P., Bertocin, P., Patriarca, P., Calzoni, P., Zabucchi, G. 1992. Identification of elastase in human eosinophils: immunolocalization, isolation, and partial characterization. *Arch Biochem Biophys* **292**:128-139.
- Lyons, P.D., Benveniste, E.N. 1998. Cleavage of membrane-associated ICAM-1 from astrocytes: Involvement of a metalloprotease. *Glia* **22**:103-112.
- Mainardi, C.L., Hasty, D.L., Seyer, J.M., Kang, A.H. 1980. Specific cleavage of human type III collagen by human polymorphonuclear leukocyte elastase. *J Biol Chem* **255**:12006-12010.
- Maio, M., Tessitori, G., Pinto, A., Temponi, M., Colombatti, A., Ferrone, S. 1989. Differential role of distinct determinants of intercellular adhesion molecule-1 in immunologic phenomena. *J Immunol* **143**:181-188.
- Makgoba, M.W., Sanders, M.E., Ginther-Luce, G.E., Dustin, M.L., Springer, T.A., Clark, E.A., Mannoni, P., Shaw, S. 1988. ICAM-1 a ligand for LFA-1-dependent adhesion of B, T, and myeloid cells. *Nature* **331**:86-88.
- Manning, A.M., Lu, H.F., Kukielka, G.L., Oliver, M.G., Ty, T., Toman, C.A., Drong, R.F., Slightom, J.L., Ballantyne, C.M., Entman, M.L., Smith, C.W., Anderson,

- D.C. 1995. Cloning and comparative sequence analysis of the gene encoding canine intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1). *Gene* **156**:291-295.
- Marlin, S.D., Springer, T.A. 1987. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* **51**:813-819.
- Marlin, S.D., Staunton, D.E., Springer, T.A., Stratowa, C., Sommergruber, W., Merluzzi, V.J. 1990. A soluble form of intercellular adhesion molecule-1 inhibits rhinovirus infection. *Nature* **344**:70-72.
- Martin, S., Martin, A., Staunton, D.E., Springer, T.A. 1993. Functional studies of truncated soluble intercellular adhesion molecule-1 expressed in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **37**:1278-1285.
- Martin, S., Casasnovas, J.M., Staunton, D.E., Springer, T.A. Efficient neutralization and disruption of rhinovirus by chimeric ICAM-1/immunoglobulin molecules. *J Virol* **67**:3561-3568.
- McClelland, A., DeBear, J., Connolly Yost, S., Meyer, A.M., Marlor, C.W., Greve, M. 1991. Identification of monoclonal antibody epitopes and critical residues for rhinovirus binding in domain 1 of intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**:7993-7997.
- McCourt, P.A.G., Ek, B., Forsberg, N., Gustafson, S. 1994. Intercellular adhesion molecule-1 is a cell surface receptor for Hyaluronan. *J Biol Chem* **269**:30081-30084.
- McDonald, J.A., Kelley, D.G. 1980. Degradation of fibronectin by human leukocyte elastase. Release of biologically active fragments. *J Biol Chem* **255**:8848-8859.
- McElvaney, N.G., Hubbard, R.C., Birrer, P., Chernick, M.S., Caplan, D.B., Frank, M.M., Crystal, R.G. 1991. Aerosol α 1-antitrypsin treatment for cystic fibrosis. *Lancet* **337**:392-394.
- McRae, B., Nakajima, K., Travis, J., Powers, J.C. 1980. Studies on reactivity of human leukocyte elastase, cathepsin G, and porcine pancreatic elastase toward peptides including sequences related to the reactive sites of α 1-protease inhibitor (α 1-antitrypsin). *Biochemistry* **19**:3973-3978.
- Meier, H.L., Schulman, E.S., Heck, L.W., MacGlashan, D., Newball, H.H., Kaplan, A.P. 1989. Release of elastase from purified human lung mast cells and basophils. *Inflammation* **13**:295-306.
- Meyer, D.M., Dustin, M.L., Carron, C.P. 1995. Characterization of intercellular adhesion molecule-1 ectodomain (sICAM-1) as an inhibitor of lymphocyte function-associated molecule-1 interaction with ICAM-1. *J Immunol* **155**:3578-3584.

- Miller, J., Knorr, R., Ferrone, M., Houdei, R., Carron, C.P., Dustin, M.L. 1995. Intercellular adhesion molecule-1 dimerisation and its consequences for adhesion mediated by lymphocyte function associated-1. *J Exp Med* **182**:1231-1241.
- Möst, J., Schwaeble, W., Dierich, M.P. 1992a. Expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) on human monocytes. *Immunobiol* **185**:327-336.
- Möst, J., Schwaeble, W., Drach, J., Sommerauer, A., Dierich, M.P. 1992b. Regulation of the expression of ICAM-1 on human monocytes and monocytic tumor cell lines. *J Immunol* **148**:1635-1642.
- Nakajima, K., Powers, J.C. 1979. Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leukocyte elastase; Studies with peptide substrates related to the α 1-protease inhibitor reactive site. *J Biol Chem* **254**:40274032.
- Navia, M.A., Brian, McKeever, B.M., Springer, J.P., Lin, T.-Y., Williams, H.R., Fluder, E.M., Dorn, C.P., Hoogsteen. 1989. Structure of human neutrophil elastase in complex with a peptide chloromethyl ketone inhibitor at 1.84-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**:7-11.
- Ockenhouse, C.F., Betageri, R., Springer, T.A., Staunton, D.E. 1992. *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes bind ICAM-1 at a site distinct from LFA-1, Mac-1 and human rhinovirus. *Cell* **68**:63-69.
- Ohlsson, K., Olsson, I. 1974. The neutral proteases of human granulocytes. *Eur J Biochem* **12**:519-530.
- Ohlsson, S., Tufvesson, B., Polling, A., Ohlsson K. 1997. Distribution of the secretory leucocyte proteinase inhibitor in human articular cartilage. *J Biol Chem* **378**:1055-1058.
- Owen, C.A., Campbell, M.A., Sannes, P.L., Boukedes, S.S., Campbell, E.J. 1995. Cell surface-bound elastase and cathepsin G on human neutrophils: A novel, non-oxidative mechanism by which neutrophils focus and preserve catalytic activity of serine proteinases. *J Cell Biol* **131**:775-789.
- Perlmutter, D.H., Cole F.S., Kilbridge, P., Rossing, T.H., Colten, H.R. 1985. Expression of the α 1-proteinase inhibitor gene in human monocytes and macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**:795-799.
- Piela, T.H., Korn, J.H. 1990. ICAM-1-dependent fibroblast-lymphocyte adhesion: discordance between surface expression and function of ICAM-1. *Cell Immunol* **129**:125-137.
- Pigott, R., Dillon, L.P., Hemingway, I.H., Gearing, A.J.H. 1992. Soluble forms of E-Selectin, ICAM-1 and VCAM-1 are present in the supernatants of cytokine activated cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **187**:584-589.

- Plow, E.F. 1982. Leukocyte elastase release during blood coagulation. *J Clin Invest* **69**:564-576.
- Reilly, P.L., Woska, J.R., Jeanfavre, D.D., McNally, E., Rothlein, R., Bormann, B.J. 1995. The native structure of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a dimer; Correlation with binding to LFA-1. *J Immunol* **155**:529-532.
- Remold-O'Donnell, E. 1985. A fast-acting elastase inhibitor in human monocytes. *J Exp Med* **162**:2142-2155
- Remold-O'Donnell, E., Nixon, J.C., Rose, R.M. 1989. Elastase inhibitor: characterization of the human elastase inhibitor molecule associated with monocytes, macrophages, and neutrophils. *J Exp Med* **169**:1071-1080.
- Remold-O'Donnell, E., Parent, D. 1995. Specific sensitivity of CD43 to neutrophil elastase. *Blood* **86**:2395-2402.
- Renesto, P., Si-Tahar, M., Moniatte, M., Balloy, V., Van Dorsselaer, A., Pidard, D., Chignard, M. 1997. Specific inhibition of thrombin-induced cell activation by the neutrophil proteinase elastase, cathepsin G, and proteinase 3: Evidence for distinct cleavage sites within the aminoterminal domain of the thrombin receptor. *Blood* **89**:1944-1953.
- Roberts, R.M., Mathialagan, N., Duffy, J.Y., Smith, G.W. 1995. Regulation and regulatory role of proteinase inhibitors. *Crit Rev Euk Gen Exp* **5**:385-436.
- Rothlein, R., Czajkowski, M., O'Neill, M.M., Marlin, S.D., Mainolfi, E., Merluzzi, V.J. 1988. Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. *J Immunol* **141**:1665-1669.
- Rothlein, R., Kishimoto, T.K., Mainolfi, E. 1993. Cross-linking of ICAM-1 induces co-signaling of an oxidative burst from mononuclear leukocytes. *J Immunol* **152**:2488-2495.
- Rothlein, R., Mainolfi, E.A., Czajkowski, Marlin, S.D. 1991. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J Immunol* **147**:3788-3793.
- Sallenave, J.M., Si-Tahar, M., Cox, G., Chignard, M., Gauldie, J. 1997. Secretory leukocyte proteinase inhibitor is a major leukocyte elastase inhibitor in human neutrophils. *J Leuk Biol* **61**:695-702.
- Salva, P.S., Doyle, N.A., Graham, L., Eigen, H., Doerschuk, C.M. 1996. TNF- α , IL-8, soluble ICAM-1, and neutrophils in sputum of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol* **21**:11.
- Senior, R.M., Huang, J.S., Griffin, G.L., Deuel, T.F. 1985. Dissociation of the chemotactic and mitogenic activities of platelet-derived growth factor by human neutrophil elastase. *J Cell Biol* **100**:351-359.

- Seth, R., Raymond, F.D., Makgoba, M.W. 1991. Circulating ICAM-1 isoforms: diagnostic prospects for inflammatory and immune disorders. *Lancet* **338**:83-84.
- Seventer, G.A., Shimizu, Y., Horgan, K.J., Shaw, S. 1990. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. *J Immunol* **144**:4579-4586.
- Shapiro, A.L., Vinuela, E., Maizel, J.V. Jr. 1967. Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem Biophys Res Commun* **28**:815-820.
- Simmons, D., Malegapuru, W.M., Seed, B. 1988. ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature* **331**:624-627.
- Sinha, S., Watorek, W., Karr, S., Giles, J., Bode, W., Travis, J. 1987. Primary structure of human neutrophil elastase. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**:2228-2232.
- Si-Tahar, M., Pidard, D., Balloy, V., Moniatte, M., Kieffer, N., Van Dorsselaer, A., Chignard, M. 1997. Human neutrophil elastase proteolytically activates the platelet integrin α IIb β 3 through cleavage of the carboxyl terminus of the α IIb subunit heavy chain. *J Biol Chem* **272**:11636-11647.
- Siu, G., Hedrick, S.M., Brian, A.A. 1989. Isolation of the murine intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene. *J Immunol* **143**:3813-3820.
- Sligh, J.E., Ballantyne, C.M., Rich, S.S., Hawkins, H.K., Smith, C.W., Bradley, A., Beaudet, A.L. 1993. Inflammatory and immune responses are impaired in mice deficient in intercellular adhesion molecule-1. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**:8529-8533.
- Springer, T.A. 1990. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**:425-434.
- Solomon, A., Gramse, M., Havemann, K. 1978. Proteolytic cleavage of human IgG molecules by neutral proteases of polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Immunol* **8**:782-785.
- Staunton, D.E., Dustin, M.L., Erickson, H.P., Springer T.A. 1990. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell* **61**:243-254.
- Staunton, D.E., Dustin, M.L., Springer, T.A. 1989. Functional cloning of ICAM-2, a cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* **339**:61-64.
- Staunton, D.E., Marlin, S.D., Stratowa, C., Dustin, M.L., Springer, T.A. 1988. Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* **52**:925-933.

- Staunton, D.E., Merluzzi, V.J., Rothlein, R., Barton, R., Marlin, S.D., Springer, T.A. 1989. A cell adhesion molecule, ICAM-1, is the major surface receptor for rhinoviruses. *Cell* **56**:849-853.
- Stockley, R.A. 1994. The role of proteinases in the pathogenesis of chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med* **150**:S109-113.
- St-Pierre, Y., Desrosiers, M., Tremblay, P., Estève, P.-O., Opdenakker, G. 1996. Flow cytometric analysis of gelatinase B (MMP-9) activity using immobilized fluorescent substrate on microspheres. *Cytometry* **25**:374-380.
- Takahashi, H., Nukiwa, T., Yoshimura, K., Quick, C.D., States, D.J., Holmes, M.D., Whang-Peng, J., Knutsen, T., Crystal, R.G. 1988. Structure of the human neutrophil elastase gene. *J Biol Chem* **263**:14739-14747.
- Taylor, J.C., Crawford, I.P., Hugli, T.E. 1977. Limited degradation of the third component (C3) of human complement by human leukocyte elastase (HLE): Partial characterization of C3 fragments. *Biochemistry* **16**:3390-3398.
- Thompson, R.C., Ohlsson, K. 1986. Isolation, properties, and complete amino acid sequence of human secretory leukocyte protease inhibitor, a potent inhibitor of leukocyte elastase. *Proc Natl Acad Sci USA* **83**:6692-6696.
- Tian, L., Yoshihara, Y., Mizuno, T., Mori, K., Gahmberg, C.G. 1997. The neuronal glycoprotein telencephalin is a cellular ligand for the CD11a/CD18 leukocyte integrin. *J Immunol* **158**:928-936.
- Tosi, M.F., Berger, M. 1988. Functional differences between the 40 kDa and 50 to 70 kDa IgG Fc receptors on human neutrophils revealed by elastase treatment and antireceptor antibodies. *J Immunol* **141**:2097-2102.
- Travis, J. 1988. Structure, function, and control of neutrophil proteinases. *Am J Med* **84**:37-42.
- van de Stolpe, A., van der Saag, P.T. 1996. Intercellular adhesion molecule-1. *J. Mol. Med.* **74**:13-33.
- Vanky, F., Wang, P., Patarroyo, M., Klein, E. 1990. Expression of the adhesion molecule ICAM-1 and major histocompatibility complex class I antigens on human tumor cells is required for their interaction with autologous lymphocytes in vitro. *Cancer Immunol Immunother* **31**:19-27.
- Vignola, A.M., Chanez, P., Campbell, A.M., Pinel, A.M., Bousquet, J., Michel, F.B., Godard, P.H. 1994. Quantification and localization of HLA-DR and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) molecules on bronchial epithelial cells of asthmatics using confocal microscopy. *Clin Exp Immunol* **96**:104-110.

- Voraberger, G., Schäfer, R., Straowa, C. 1991. Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. *J Immunol* **147**:2777-2786.
- Wakatsuki, T., Kimura, K., Kimura, F., Shimomiya, N., Ohtsubo, M., Ishizawa, M., Yamamoto, M. 1995. A distinct mRNA encoding a soluble form of ICAM-1 molecule expressed in human tissues. *Cell Adhes Commun* **3**:283-292.
- Welder, C.A., Lee, D.H., Takei, F. 1993. Inhibition of cell adhesion by microspheres coated with recombinant soluble intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* **150**:2203-2210.
- Wiedow, O., Schröder, J.M., Gregory, H., Young, J.A., Christophers, E. 1990. Elafin: An elastase-specific inhibitor of human skin. *J Biol Chem* **265**:14791-14795.
- Williams, H.R., Lin, T.-Y., Navia, M.A., Springer, J.P., McKeever, B.M., Hoogsteen, K., Dorn, C.P. 1987. *J Biol Chem* **262**:17178-17181.
- Woodman, R.C., Reinhardt, P.H., Kanwar, S., Johnston, F.L., Kubes, P. 1993. Effects of human neutrophil elastase (HNE) on neutrophil function in vitro and in inflamed microvessels. *Blood* **82**:2188-2195.
- Xu, H., Gonzalo, J.A., St Pierre, Y., Williams, I.R., Kupper, T.S., Cotran, R.S., Springer, T.A., Gutierrez-Ramos, J.C. 1994. Leukocytosis and resistance to septic shock in intercellular adhesion molecule 1-deficient mice. *J Exp Med* **180**:95-109.
- Ybarrondo, B., O'Rourke, A.M., Brian, A.A., Mescher, M.F. 1994. Contribution of lymphocyte function-associated-1/intercellular adhesion molecule-1 binding to the adhesion/signaling cascade of cytotoxic T lymphocyte activation. *J Exp Med* **179**:359-363.

ANNEXE

Cet article a dû être [retiré, retirée] en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

