Journal de la Société de Biologie, 195 (2), 173-179 (2001)

Les élastases

Joseph G. Bieth

Laboratoire d'Enzymologie, INSERM U 392, Faculté de Pharmacie, 74 route du Rhin, 67400 Illkirch

Reçu le 29 janvier 2001

RÉSUMÉ

Les élastases sont des protéases capables de solubiliser l'élastine fibreuse. Elles peuvent faire partie de la classe des sérine protéases, des cystéine protéases ou des métalloprotéases. Les élastases de mammifères se rencontrent principalement dans le pancréas et les phagocytes. Parmi les élastases de non-mammifères, on note une grande diversité de métalloélastases et de sérine élastases bactériennes. L'activité élastolytique varie fortement d'une élastase à l'autre et n'est, en général, pas corrélée au pouvoir catalytique de ces protéases. On peut mesurer cette activité avec de l'élastine native ou marquée. Avec des élastases pures, on peut utiliser des substrats synthétiques spécifiques. Il existe un grand nombre d'inhibiteurs naturels (protéiques) et synthétiques des élastases. Les élastases peuvent jouer un rôle pathologique dans l'emphysème pulmonaire, la mucoviscidose, l'infection, l'inflammation et l'athérosclérose.

SUMMARY The elastases

Elastases are proteinases capable of solubilizing fibrous elastin. They may belong to the class of serine proteinases, cysteine proteinases and metalloproteinases. Mammalian elastases occur mainly in the pancreas and the phagocytes. Among non-mammalian elastases there is a great variety of bacterial metallo and serine elastases. The elastolytic activity varies from one elastase to another and is usually not correlated with the catalytic efficiency of these proteinases. One may measure this activity using native or labelled elastins. With pure elastases one may use synthetic substrates. There is a large number of natural (proteins) and synthetic elastase inhibitors. Elastases play a pathologic role in pulmonary emphysema, cystic fibrosis, infections, inflammation and atherosclerosis.

DÉFINITION

Les élastases sont des enzymes capables de solubiliser l'élastine fibreuse par un processus protéolytique. L'élastine est un composant de la matrice extracellulaire des tissus élastiques (aorte, poumon, ligament large). Son insolubilité dans l'eau est due à la fois à sa grande richesse en acides aminés apolaires et aux liaisons croisées (desmosine, isodesmosine, lysinonorleucine...) qui relient entre elles ses chaînes polypeptidiques. Cette structure particulière lui assure la résistance à l'autoclavage et à la soude à 100° C. Celle-ci s'oppose à sa fragilité en présence d'élastases qui peuvent en assurer la solubilisation en quelques instants. La capacité de solubiliser l'élastine fibreuse doit être considérée comme la condition *sine qua non* pour qualifier une protéase d'élastase. Par exemple, une élastase qui cliverait une forme soluble d'élastine sans solubiliser l'élastine insoluble ne pourrait être qualifiée d'élastase. Il en serait de même d'une protéase qui cliverait un substrat synthétique d'élastase sans agir sur l'élastine fibreuse. Cette définition restrictive ne sous-entend pas que les élastases ne puissent cliver des protéines autres que l'élastine.

CLASSIFICATION DES ÉLASTASES SELON LA NATURE DE LEUR SITE CATALYTIQUE

Le site actif d'une enzyme se compose de deux parties : le site de liaison du substrat responsable de la spécificité de l'enzyme et le site catalytique qui opère la transformation chimique du substrat. Ce dernier permet de classer les élastases en trois catégories selon leur appartenance à la famille des protéases à sérine, à cystéine ou des métalloprotéases (Tableau I).

ORIGINE TISSULAIRE ET CELLULAIRE DES ÉLASTASES

Des élastases ont été trouvées chez tous les animaux, Mammifères et autres. La structure tridimensionnelle d'un grand nombre d'entre elles est connue. Chez les Mammifères, elles se rencontrent principalement dans le pancréas (protéines aglycosylées de 25 kDa) et les phagocytes (glycoprotéines de 30 kDa) (Tableau II). La présence de deux élastases pancréatiques chez le Porc est

TABLEAU I. – Classification des élastases d'après la nature de leur site catalytique.

Classe	Site catalytique	Exemples	Références
Sérine protéase	Asp-His-Ser	Élastases pancréatiques Élastases du neutrophile	Bieth, 1986 Bieth, 1992
Métalloprotéases	Z_n^{2+}	Métalloprotéase matricielle 9 du neutrophile Élastase de *Pseudomonas aeruginosa*	Shipley *et al.*, 1990 Bieth, 1986
Cystéine protéase	His-Cys	Cathepsine L du neutrophile papaïne	Bieth, 1992 Bieth, 1986

TABLEAU II. – Élastases présentes dans les tissus de mammifères.

Tissu ou cellule	Désignation	Activité élastolytique relative	Références
Pancréas	Élastase pancréatique de Porc	100	Bieth, 1986
	Élastase pancréatique de Porc II		
	Élastase pancréatique humaine	16	Bieth, 1986
	Élastase pancréatique cationique de Chien	200	Bieth, 1986
	Élastase pancréatique anionique de Chien		
	Élastase pancréatique de Rat	67	Bieth, 1986
Neutrophiles	Élastase du neutrophile humain	7	Bieth, 1992
	Protéase 3 du neutrophile humain	5	Bieth, 1992
	Cathepsine G du neutrophile humain	0,5	Bieth, 1992
	Élastase du neutrophile de Chien		Bieth, 1986
	Métalloprotéase matricielle 9 du neutrophile humain (92 kDa gélatinase)		Shipley *et al.*, 1996
Macrophages	Élastase du macrophage péritonéal de Souris (métalloprotéase matricielle 12)		Bieth, 1986
	Cystéine protéase du macrophage péritonéal de Souris		Bieth, 1992
	Élastase leucocytaire humaine internalisée par le macrophage alvéolaire humain	2	Bieth, 1986
	Métalloélastines du macrophage alvéolaire humain (métalloprotéases matricielles 2 et 9)		Gronski *et al.*, 1997
	Cathepsine L du macrophage alvéolaire humain		Gronski *et al.*, 1997
Monocytes	Même élastase, protéinase 3 et cathepsine G que le neutrophile		Bieth, 1986
Plaquettes	Élastase plaquettaire humaine	0,03	Robert *et al.*, 1970
Artère	Élastase artérielle humaine	10	Bellon *et al.*, 1980
Peau	Élastase du fibroblaste de peau humaine		Homsy *et al.*, 1988

exceptionnelle : la plupart des espèces, y compris l'Homme, ne possèdent qu'une seule de ces enzymes. Il est à noter que le pancréas humain synthétise aussi la protéase E apparentée à l'élastase II du pancréas de Porc, mais qui ne solubilise pas l'élastine (Barrett, 1998). Les élastases pancréatiques sont synthétisées sous forme de zymogènes. Il s'agit de sérine protéases alors que les élastases présentes dans le neutrophile, le macrophage ou les cellules tumorales sont des sérine, des métallo ou des cystéine protéases.

Le monocyte, précurseur circulant du macrophage, synthétise les trois sérine élastases du neutrophile. Au cours de sa différentiation en macrophage, il perd graduellement ses sérine élastases au profit d'une métalloprotéase.

Parmi les non-mammifères (Tableau III), on note une grande diversité de métalloprotéases et de sérine élastases bactériennes. Deux d'entre elles, l'élastase de *Pseudomonas aeruginosa* et l'α-lytic protéase ont été particulièrement étudiées. La première est une des rares élastases à posséder un caractère anionique (pI = 5,9). Son site actif contient du Zn^{2+}. Son action délétère sur les protéines d'importance biologique lui vaut d'être considérée comme facteur de virulence de *P. aeruginosa* (Bieth, 1986). L'α-lytic protéase est une sérine protéase

TABLEAU III. – Élastases présentes chez les non-mammifères (seules les enzymes purifiées sont rapportées) source : Bieth, 1986.

Élastases bactériennes
- Métalloprotéases de :
  - *Pseudomonas aeruginosa*
  - *Flavobacterium immotum*
  - *Bacillum thermoproteolyticum* (thermolysine)
  - *Clostridum histolyticum*
- Sérine élastases de :
  - *Streptomyces griseus*
  - *Lysobacter enzymogenes* (α-lytic protease)
  - *Thermoactinomyces vulgaris* (thermitase)
  - *Bacillus species* (Ya-B élastase)

Élastases présentes dans d'autres organismes
- Champignons du genre *Nanizzia*, etc
- Parasites : *Schistosoma mansoni*
- Venins de serpents : 25 espèces différentes
- Pancréas de poissons
  - *Protoptère africain*
  - Carpe
  - Poisson-chat

dont la particularité est de ne posséder dans sa séquence qu'un seul résidu histidine, celui de site catalytique Asp-His-Ser. De ce fait, cette élastase a été utilisée comme modèle des sérines protéases par voie enzymatique, RMN et structure 3 D en présence d'inhibiteurs (Barrett, 1998). La plupart des élastases pancréatiques de poissons sont des sérines protéases comme dans le cas des mammifères. Le Poisson-chat est cependant une exception : son pancréas contient une métalloprotéase à Zn^{2+} en plus d'une sérine protéase. Notons aussi que beaucoup de protéases élastolytiques mentionnées dans les Tableaux II et III ne figurent pas sous la dénomination « élastases ».

SPÉCIFICITÉ DES ÉLASTASES

Schechter et Berger (1967) ont suggéré que le site de liaison du substrat (site de spécificité) d'une protéase soit subdivisée en un certain nombre de sous-sites, chacun pouvant fixer un résidu d'amino-acide du substrat :

Protéase : S_n.... $S_4S_3S_2S_1$ $S'_1S'_2$..... S'_n
Substrat : P_n.... $P_4P_3P_2P_1$ $P'_1P'_2$..... P'_n

Les résidus de substrat sont dénommés P_1 à P_n dans la direction N-terminale et à partir de la liaison à rompre $P_1 - P'_1$ et P'_1 à P'_n dans la direction C-terminale à partir de $P_1 - P'_1$. Les sous-sites correspondants de l'enzyme sont appelés S_1 à S_n et S'_1 à S'_n. Ce mode de classification est couramment utilisé pour les protéases.

Les élastases expriment leur spécificité *via* la nature du résidu P_1 lorsqu'il s'agit de sérine protéases, du résidu P'_1 dans le cas des métalloprotéases et des résidus P_2 ou P_3 pour les cystéine protéases. La spécificité P_1 permet de classer les élastases pancréatiques en deux catégories : 1) celles qui sont spécifiques pour des résidus non encombrants (élastase pancréatique de Porc et de Chien), 2) celles qui préfèrent les résidus aromatiques ou aliphatiques encombrants (élastase II de pancréas de Porc, élastase pancréatique humaine). La plupart des sérine protéases du neutrophile sont spécifiques pour des résidus P_1 non encombrants (élastase du neutrophile de l'Homme, du Chien et du Chat, protéase 3 du neutrophile humain) alors que la cathepsine G préfère les résidus plus volumineux. Ajoutons que l'élastase pancréatique de Rat hydrolyse aussi bien les substrats à P_1 = Ala ou Tyr (Bieth, 1986).

Les métalloprotéases du neutrophile et du macrophage (métalloprotéases 2, 9 et 12) expriment leur spécificité *via* leurs interactions $S'_1 - P'_1$, les résidus P'_1 étant aliphatiques, hydrophobes ou aromatiques (Leu, Ile, Met, Tyr) (Bieth, 1986).

Parmi les élastases de non-mammifères, citons l'élastase de *Pseudomonas aeruginosa* qui exprime sa spécificité par des interactions $S'_1 - P'_1$ avec P'_1 = Leu, Phe, Tyr. Par contre, l'α-lytic protéase, une sérine élastase, est spécifique pour les substrats ayant un résidu P_1 peu encombrant comme l'élastase pancréatique de Porc. Parmi les trois élastases isolées de *Streptomyces griseus*, l'une est spécifique pour P_1 = Ala alors que l'autre hydrolyse avec la même efficacité les substrats dont P_1 = Ala, Val, Leu, Tyr et Phe (Bieth, 1986). Les trois sérine élastases du pancréas de poissons (Tableau III) sont spécifiques pour P_1 = Ala (Bieth, 1986).

Enfin, les cystéine élastases comme la cathepsine L ou la papaïne expriment leur spécificité principale par une interaction $S_2 - P_2$, P_2 étant un résidu aromatique (Bieth, 1986).

ACTIVITÉ ÉLASTOLYTIQUE DES ÉLASTASES
(Bieth, 1986, 1989, 1992)

Action comparée des élastases sur l'élastine

Le tableau II montre l'activité élastolytique relative de certaines élastases de Mammifères. Les activités les plus élevées se rencontrent cependant chez les élastases bactériennes où la thermolysine et l'élastase de *Streptomyces fradiae* ont une activité élastolytique 4 et 8 fois plus élevées que celle de l'élastase pancréatique de Porc. Les élastases de mammifères ont des activités très variables. En règle générale, les élastases pancréatiques sont significativement plus actives que les élastases du neutrophile. Il est à noter aussi que l'activité élastolytique peut dépendre de la manière dont a été préparée l'élastine : si celle-ci est préparée par traitement doux à la guanidine et à la collagénase, elle sera solubilisée beaucoup plus vite par l'élastase pancréatique de Porc et la cathepsine G du neutrophile que si elle est préparée par une technique brutale mettant en jeu la soude à chaud. Par ailleurs, l'élastase du neutrophile humain a une activité élastolytique deux fois plus faible sur l'élastine pulmonaire humaine que sur l'élastine de ligament large de bœuf.

Enfin, les fibres élastasiques étant incluses dans la matrice extracellulaire, il est peu probable que l'activité élastolytique *in vitro* d'une élastase donnée soit corrélée à son pouvoir élastolytique *in vivo*. D'autre part, le collagène et les autres macromolécules de la matrice extracellulaire peuvent protéger l'élastine contre l'action de l'élastase. Dans ce cas, des enzymes comme la collagénase endogène pourraient servir de « helper proteinases » (Bieth, 1992). Il a été montré que l'élastine de sections de peau humaine peut servir à évaluer l'activité élastolytique de l'élastase et de la cathepsin G du neutrophile. Ce substrat *ex vivo* mime la situation *in vivo* (Boudier *et al.*, 1991).

Mécanisme d'action des élastases sur l'élastine

CORRÉLATION ENTRE L'ÉLASTOLYSE ET L'ACTIVITÉ CATALYTIQUE DES ÉLASTASES

L'élastase pancréatique de Porc clive les liaisons Ala-Ala et Ala-Gly dans l'élastine. Ce résultat confirme la spécificité de cette enzyme pour des substrats synthétiques avec P_1 = Ala. De même, l'élastase II du pancréas de Porc attaque l'élastine au niveau des liaisons Leu-Ala, Phe-Ala et Tyr-Ala, confirmant la spécificité P_1 de cette enzyme (voir ci-dessus). Il n'y a cependant pas de bonne corrélation entre l'activité catalytique des élastases sur

des substrats synthétiques et leur activité élastolytique. Par exemple, les meilleurs substrats synthétiques de l'élastase pancréatique de Porc et de l'élastase du neutrophile humain possèdent des valeurs de k_{cat}/K_m similaires (McRhae, *et al.,* 1980) indiquant qu'elles ont des activités catalytiques équivalentes. Pourtant, les deux enzymes solubilisent l'élastine à des vitesses très différentes. Ceci pourrait être dû au fait que l'enzyme pancréatique est spécifique pour P_1 = Ala alors que l'enzyme du neutrophile est spécifique pour P_1 = Val et que Ala et Val ne se trouvent pas en quantité équivalente dans l'élastine. L'exemple qui suit démontre cependant que cette explication ne semble pas suffisante. L'élastase pancréatique de Porc et de Chien sont toutes les deux spécifiques pour P_1 = Ala. La première hydrolyse un substrat synthétique à P_1 = Ala plus vite que la deuxième alors que l'inverse est vrai pour la solubilisation de l'élastine.

En résumé, la vitesse à laquelle une élastase donnée solubilise l'élastine ne dépend pas tellement de la spécificité et de l'activité catalytique de l'enzyme mais peut être influencée par la nature de l'élastine.

Caractéristiques de la réaction de solubilisation de l'élastine

Ayant lieu en phase hétérogène, la réaction élastase-élastine semble bien plus compliquée qu'une réaction protéase-protéine en phase soluble. L'insolubilité a pour conséquences : *a*) de rendre l'accès de l'enzyme difficile « le soluble préfère le soluble à l'insoluble », *b*) de maintenir l'enzyme concentrée autour du substrat, *c*) de concentrer les charges du substrat, ce qui peut influencer l'adsorption de l'enzyme. Par ailleurs, les peptides solubles issus de l'élastolyse peuvent fixer l'élastase et mimer une inhibition.

On sait que la taille des peptides solubilisés varie avec les élastases et la composition du milieu réactionnel. On peut donc imaginer que deux élastases A et B possèdent la même vitesse globale d'élastolyse alors que l'élastase A clive les liaisons peptidiques de l'élastine à une vitesse v_A et produit des fragments d'une certaine taille alors que l'élastase B clive ces liaisons substrat à une vitesse $v_B >> v_A$ mais produit des fragments de moindre taille. En somme, une bonne élastase n'est pas forcément une protéase qui clive beaucoup de liaisons peptidiques dans l'élastine.

Sur un substrat fibreux aussi compliqué que l'élastine on peut s'attendre à observer des liaisons enzyme-substrat non productives c'est-à-dire des liaisons qui ne conduisent pas à une protéolyse. De telles liaisons ont été suggérées dans le cas de l'élastase pancréatique de Porc et de l'élastase du neutrophile humain.

Enfin, les charges positives ou négatives de l'élastine n'ont en général pas d'importance pour l'élastolyse, même si cette importance a été reconnue pour certaines élastases. Il semble probable que l'interaction productive entre l'élastine et les élastases soit plutôt de nature hydrophobe.

MESURE DE L'ACTIVITÉ DES ÉLASTASES

On peut utiliser soit de l'élastine fibreuse comme substrat, soit un peptide synthétique. Parmi les nombreuses méthodes élastolytiques, nous citerons d'abord celle de Ardelt et *al.* (1970) qui utilise l'élastine non marquée dont la solubilisation est suivie à 276 nm. Cette méthode est sensible et fiable. Lorsque l'échantillon absorbe la lumière à 276 nm, il est conseillé d'utiliser des techniques à l'élastine marquée dont celle complexée covalentiellement au Bleu brillant de remazol qui existe dans le commerce. Cette technique est également fiable et sensible (Bieth *et al.,* 1976). Si on veut accroître la sensibilité de la méthode, on peut utiliser l'élastine tritiée (Takahashi *et al.,* 1973), qui n'est cependant pas disponible commercialement.

De nombreux substrats synthétiques des élastases ont été décrits. Les plus fréquemment employés figurent dans le tableau IV. Ces composés sont en général disponibles commercialement. Notons que les *p*-nitroanilides sont des substrats chromogènes alors que les substrats des métalloprotéases sont fluorigènes.

INHIBITION DES ÉLASTASES

Inhibiteurs des sérine élastases

Les inhibiteurs protéiques des principales sérine élastases du pancréas et du neutrophile figurent dans le tableau V. L'α_1-antitrypsine et l'inhibiteur bronchique sont d'une très grande importance physiopathologique

Tableau IV. – Substrats synthétiques de quelques élastases. k_{cat} et K_m sont les paramètres cinétiques de la réaction enzyme-substrat : $v = k_{cat} [E]_o/(1 + K_m/[S]_o)$; le rapport k_{cat}/K_m traduit la sensibilité du substrat. Suc = succinyl, MeOSuc = methoxysuccinyl, *p*NA = p.nitroanilide, Mca = (7 méthoxycoumarine-4 yl) acétyl, Dpa = N-3-(2,4 dinitrophenyl)-L-2,3-diaminopropionyl.

Enzyme	Substrat	k_{cat}/K_m (M^{-1} s^{-1})	Références
Élastase pancréatique de Porc	Suc-Ala-Ala-Ala-*p*NA	12.000	Davril ++ 84
Élastase pancréatique humaine	Suc-Ala-Ala-Pro-Met-*p*NA	4.900	Del Mar ++ 80
Élastase du neutrophile humain	MeOSuc-Ala-Ala-Pro-Val-*p*NA	120.000	Nakajima ++ 79
Protéase 3 du neutrophile humain	MeOSuc-Lys-(2 picolinoyl)Ala-Pro-Val-*p*NA	30.600	Früh ++ 96
Cathepsine G du neutrophile humain	Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*NA	1.100	Nakajima ++ 79
Métalloprotéase matricielle 2 humaine	Mea-Pro-Leu-Gly ↓ Leu-Dpa-Ala-Arg	630.000	Knight ++ 1992 dans HB
Élastase de *Pseudomonas aeruginosa*	2-aminobenzoyl-Ala-Gly ↓ Leu-Ala-4-nitrobenzylamide	910.000	Nishino + Powers 1980

TABLEAU V. – Inhibiteurs protéiques des principales sérine élastases.

Inhibiteurs	Élastases pancréatiques		Élastases du neutrophile humain		
	Porcine	Humaine	Élastase	Protéase 3	Cathepsine G
α_1-antitrypsine[a]	+	+	+	+	+
α_1-antichymotrypsine	–	+	–	–	+
α_2-macroglobuline	+	+	+	+	+
Inhibiteur bronchique[b]	–	+	+	–	+
Élafine	+	–	+	+	–
Eglin c	–	+	+	+	+

[a] Autre dénomination : α1-proteinase inhibitor.
[b] Autres dénominations : secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), mucus proteinase inhibitor (MPI).

puisqu'ils assurent l'inhibition des élastases du neutrophile au niveau pulmonaire. La première est une glycoprotéine de 53 kDa synthétisée dans le foie et véhiculée par le sang. La structure tridimensionnelle de la forme libre et complexée à la trypsine est connue (Elliott *et al.*, 1996 ; Carell *et al.*, 2000). Elle fait partie de la famille structurale et fonctionnelle des serpines qui agissent comme des inhibiteurs irréversibles. Il existe un très grand nombre de phénotypes de cette protéine dont l'un, le mutant Z, est responsable d'une forme héréditaire d'emphysème pulmonaire. Les résidus $P_1 - P'_1$ de cet inhibiteur sont Met – Ser, ce qui rend l'inhibiteur sensible aux oxydants de la fumée de cigarettes ce qui explique en partie l'emphysème du fumeur. Les métalloprotéases et certaines sérine protéases peuvent cliver l'α_1-antitrypsine au niveau de son site actif et le rendre inactif. L'α_1-antichymotrypsine est une glycoprotéine plasmidique de 58 kDa qui fait également partie de la famille des serpines. Elle pourrait protéger le tissu pulmonaire contre la protéolyse due à la cathepsine G du neutrophile (Duranton *et al.*, 2000).

L'inhibiteur bronchique se trouve dans tous les mucus y compris celui des voies respiratoires. Il s'agit d'un inhibiteur réversible de 11,7 kDa qui a un résidu Met en P'_1 ce qui fait que son activité est diminuée par les oxydants (Boudier & Bieth, 1994). Il est formé de deux domaines ayant la même architecture. Le site actif est porté par le domaine C-terminal. L'élafine est un inhibiteur réversible de 6 kDa isolé du poumon et de la peau. Sa structure est apparentée au domaine C-terminal de l'inhibiteur bronchique. L'eglin c est un inhibiteur de 9 kDa trouvé dans la sangsue et préparé en grande quantité par génie génétique à des fins thérapeutiques.

L'α_2-macroglobuline est une glycoprotéine de 725 kDa composée de deux sous-unités reliées entre elles de façon covalente. Elle forme des complexes très affines avec les sérine, les cystéine, les métallo et les carboxylprotéases. Sa caractéristique est de former avec ces protéases des complexes enzymatiquement actifs sur les substrats synthétiques et inactifs sur les substrats protéiques.

Inhibiteurs de faible masse moléculaire de l'élastase et de la cathepsine G du neutrophile

L'élastase et la cathepsine G du neutrophile humain sont inhibées par les glycosaminoglycanes sulfatés tels que l'héparine ainsi que par les polynucléotides comme l'ADN (Cadène *et al.*, 1995 ; Ermolieff *et al.*, 1998 ; Duranton *et al.*, 2000). L'élastase est inhibée par l'élastinale alors que la cathepsine G est inhibée par la chymostatine, tous deux produits par un microorganisme. Un très grand nombre d'antiélastases ont été synthétisées à des fins thérapeutiques pour le traitement de l'inflammation et de l'emphysème (Edwards & Bernstein, 1994 ; Skiles & Young, 1999). Certaines de ces molécules sont de très puissants inhibiteurs et sont actuellement en essai clinique.

Inhibiteurs des métalloprotéases

Toutes ces élastases sont inhibées par l'α_2-macroglobuline mentionnée ci-dessus. L'élastase de *Pseudomonas aeruginosa* est inhibée par le phosphoramidon d'origine microbienne et les chélateurs. Les métalloprotéases matricielles 2 et 9 présentes dans le neutrophile humain sont inhibées par les chélateurs du Zn^{2+} (hydroxamate) et les TIMP (tissue inhibitors of metalloproteases). Les TIMPs sont des protéines de 20 à 25 kDa qui forment des complexes réversibles à forte affinité pour les métalloprotéases matricielles.

RÔLE PATHOLOGIQUE DES ÉLASTASES
(Bieth, 1986, 1992)

Emphysème pulmonaire

Cette insuffisance respiratoire se définit comme une altération anatomique du poumon avec élargissement des voies aériennes distales par rapport aux bronchioles non-respiratoires terminales et destruction des parois alvéolaires. La destruction partielle des fibres d'élastine et de collagène est une caractéristique de l'emphysème. Par contre, l'insuffisance respiratoire ne l'est pas.

En 1963, Laurell & Eriksson ont trouvé une association entre le déficit héréditaire en α_1-antitrypsine et l'emphysème précoce. Des études ultérieures ont montré qu'en cas de déficit sévère, la fréquence de l'emphysème est très élevée. Ces maladies ont habituellement le phénotype Pi ZZ. Les sujets dont les taux d'α_1-antitrypsine sont intermédiaires (phénotype Pi MZ) contractent

moins fréquemment un emphysème. On sait aujourd'hui que beaucoup de formes d'α_1-antitrypsine en dehors du variant Z peuvent donner lieu à de l'emphysème. Ce qui caractérise Z c'est sa grande fréquence qui a permis de démontrer son rôle pathogénique. L'inhibition de l'élastase du neutrophile par l'α_1-antitrypsine suggère que cette protéase est responsable de l'emphysème associé au déficit d'inhibiteur. Ce point de vue a été confirmé par les nombreuses expérimentations animales montrant que l'instillation intratrachéale d'élastase provoque des lésions pulmonaires rappelant celles de l'emphysème. La protéase 3 leucocytaire (myéloblastine) possède une activité élastolytique proche de celle de l'élastase et provoque également des lésions emphysémateuses chez le Hamster (Kao *et al.,* 1988). Cette enzyme est elle aussi inhibée par l'α_1-antitrypsine et pourrait donc aussi jouer un rôle pathogénique dans l'emphysème.

Le déficit héréditaire en α_1-antitrypsine, discuté ci-dessus, engendre l'emphysème panlobulaire (destruction des alvéoles) qui ne représente qu'un faible pourcentage de tous les cas d'emphysème. La forme la plus fréquente de la maladie est l'emphysème centrolobulaire (destruction des bronchioles) qui survient chez les fumeurs ayant un taux normal d'α_1-antitrypsine. La pathogénie de l'emphysème du fumeur est plus difficile à comprendre. Il a été démontré *in vitro* que la fumée de cigarette et les phagocytes activés détruisent par oxydation le pouvoir inhibiteur de l'α_1-antitrypsine. Ces expériences ont conduit à la notion de déficit acquis (par les oxydants) d'α_1-antitrypsine s'opposant au déficit congénital de l'inhibiteur. Ce point de vue est complété par les observations suivantes :

– le poumon de fumeur est plus riche en neutrophiles (et donc en activité élastasique potentielle) que le poumon de non fumeur ;

– chez le fumeur, les trois sérine protéases peuvent être libérées du neutrophile par un certain nombre de stimuli. Ces protéases n'agissent pas toutes sur l'élastine mais elles favorisent l'élastolyse en clivant les autres protéines de la matrice extracellulaire. Le contrôle de ces protéases par l'α_1-antitrypsine peut être gêné par les oxydants ou par l'ADN issu des neutrophiles éclatés (Duranton *et al.,* 2000) ;

– les fumeurs ont un nombre accru de macrophages dans leurs structures alvéolaires. Ces cellules contiennent entre autres des métalloprotéases, les métalloprotéases matricielles 2 et 9 qui peuvent cliver l'élastine pulmonaire (Barrett, 1998). Des expériences chez la Souris démontrent une relation entre le tabagisme, les métalloprotéases et l'emphysème. En effet, des souris rendues génétiquement déficientes en métalloélastase sont résistantes à une exposition de fumée de cigarettes alors que les souris sauvages soumises au même traitement développent un emphysème (Hautamaki *et al.,* 1997).

Notons enfin qu'à côté de l'α_1-antitrypsine, il existe deux antiélastases de faible masse moléculaire, l'inhibiteur bronchique et l'élafine (paragraphe 7) dont la concentration dans le poumon profond est inférieure à celle de l'α_1-antitrypsine mais qui peuvent néanmoins être efficaces car elles peuvent diffuser facilement dans la matrice extracellulaire et inhibe l'élastase liée à l'élastine.

Infections

Pseudomonas aeruginosa est un germe opportuniste qui infecte divers types de patients y compris ceux atteints de mucoviscidose. L'élastase de *P. aeruginosa* inactive un grand nombre de protéines (immunoglobuline IgG, IgA, complément, lysozyme, α_1-antitrypsine, α_1-antichymotrypsine, etc.). Elle joue un rôle dans les infections impliquant cette bactérie, à savoir la pneumonie, les blessures, la cornée. D'une façon générale l'infection a un pouvoir leucoattractif et s'accompagne de libération *in situ* de protéases du neutrophile. Ces dernières sont par exemple responsables de la dégradation de certaines protéines plasmatiques au cours de la septicémie malgré le fait qu'une partie d'entre elles soient inhibées par les inhibiteurs plasmatiques.

Maladies inflammatoires et athérosclérose

L'arthrite rhumatoïde se caractérise par une destruction protéolytique du collagène et du cartilage articulaire qui pourrait être due aux protéases du neutrophile. Ces derniers agiraient malgré la présence d'α_1-antitrypsine car celle-ci pourrait être partiellement oxydée ou dégradée.

Les élastases pourraient également jouer un rôle pathologique dans l'athérosclérose, une affection au cours de laquelle on note une fragmentation des fibres élastiques des artères. Diverses sérine élastase ont été isolées de l'aorte. Notons aussi que la métalloprotéase matricielle 9 du macrophage est capable de dégrader l'élastine artérielle (Katsuda *et al.,* 1994). Puisque les plaquettes envahissent l'intérieur des vaisseaux, leur élastase peut aussi jouer un rôle dans l'athérogenèse (Robert *et al.*, 1970).

BIBLIOGRAPHIE

Ardelt W., Ksiezny S. & Niedzwiecka-Namyslowska I., Spectro photometric method for the determination of pancreatopeptidase E activity. *Anal. Biochem.,* 1970, *34*, 180-187.

Barrett A. J., Handbook of proteolytic enzymes. Rawlings N. D. & Woessner Jr. J. F. Editors, 1998, Academic Press, London.

Bellon G., Oyama T., Hornebeck W. & Robert L., Isolation and partial characterization of an elastase-type enzyme from human arterial wall by lima-bean trypsin inhibitor affinity chromatography. *Artery*, 1980, *7*, 290-302.

Bieth J. G., Elastases: catalytic and biological properties *in* Biology of extra-cellular matrix regulation of matrix accumulation, Mecham R. P. ed., Academic Press, New York, 1986, vol. 1, pp 217-320.

Bieth J. G., Lung proteinases and emphysema *in* Biochemistry of pulmonary emphysema (Grassi C., Travis J., Cassali L. & Luisetti M. eds) Bi and GiPublishers, Verona, 1992, pp 35-46.

Bieth J. G., Mechanism of action of elastases, *in* Elastin and elastases (Robert L. & Hornebeck W. eds) CRC Press, Boca Raton, 1989, vol. II, pp 13-22.

Bieth J. G., Pichoir M. & Métais P., Pseudo-zero order solubilization of remazol- brilliant-blue-elastin by elastase. *Analyt. Biochem.*, 1976, *70*, 430-433.

Boudier C. & Bieth J. G., Oxidized mucus proteinase inhibitor: a fairly potent neutrophil elastase inhibitor. *Biochem. J.*, 1994, *303*, 61-68.

Boudier C., Godeau G., Hornebeck W., Robert L. & Bieth J. G., The elastolytic activity of cathepsin G. An *ex vivo* study with dermal elastin. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 1991, *4*, 497-503.

Cadène M., Boudier C., Daney de Marcillac G. & Bieth J. G., Influence of low molecular mass heparin on the kinetics of neutrophil elastase inhibition by mucus proteinase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 1995, *270*, 13204-13209.

Davril M., Jung M. L., Duportail G., Lohez M., Han K. K. & Bieth J. G. Arginine modification in elastase. Effect on catalytic activity and conformation of the calcium-binding site. *J. Biol. Chem.*, 1984, *259*, 3851-3857.

Del Mar E. G., Brodrick J. W., Geokas M. C. & Largman C., Effect of oxidation of methionine in a peptide substrate for human elastases: a model for inactivation of α_1-protease inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1979, *88*, 346-350.

Duranton J., Boudier C., Belorgey D. Mellet P. & Bieth J. G., DNA strongly impairs the inhibition of cathepsin G by α_1-antichymotrypsin and α_1-proteinase inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 2000, *275*, 3787-3792.

Edwards P. D. & Bernstein P. R., Synthetic inhibitors of elastase. *Med. Res. Rev.*, 1994, *14*, 127-194.

Elliott P. R., Lomas D. A., Carrell R. W. & Abrahams J. P., Inhibitory conformation of the reactive loop of α-1-antitrypsin. *Nat. Struct. Biol.*, 1996, *3*, 676-681.

Ermolieff J., Duranton J., Petitou M. & Bieth J. G., Heparin accelerates the inhibition of cathepsin G by mucus proteinase inhibitor. Potent effect of o-butyrylated heparin. *Biochem. J.*, 1998, *330*, 1369-1374.

Früh H., Kostoulas G., Michel B. A. & Baici A., Human myeloblastin (leukoproteinase 3): rections with substrates, inactivators and activators in comparison with leukocyte elastase. *Biol. Chem.*, 1996, *377*, 579-586.

Gronski T. J. J., Martin R. L., Kobayashi D. K., Walsh B. C., Holman M. C., Huber M., Van Wart H. E. & Shapiro S. D., Hydrolysis of a broad spectrum of extracellular matrix proteins by human macrophage elastase. *J. Biol. Chem.* 1997, *272*, 12189-12194.

Hautamaki R. D., Kobayashi D. K., Robert M. Senior & Shapiro S. D., Requirement for macrophages elastase for cigarette smoke-induced emphysema in Mice. *Science*, 1997, *277*, 2002-2004.

Homsy R., Pelletier-Lebon P., Tixier J., Godeau G., Robert L. & Hornebeck W., Characterization of human skin fibroblasts elastase activity. *J. Invest. Dermatol.* 1988, *91*, 472-477.

Huntington J. A., Read R. J. & Carrell R. W., Structure of a serpin-protease complex shows inhibitor by deformation. *Nature*, 2000, *407*, 923-926.

Kao R. C., Wehner N. G., Skubitz K. M., Gray B. H. & Hoidal J. R., Proteinase 3. A distinct human polymorphonuclear leukocyte proteinase that produces emphysema in hamsters. *J Clin Invest.* 1988, *82*, 1963-1973.

Katsuda S., Okada Y., Okada Y., Imai K. & Nakanishi I., Matrix metalloprotease-9 (92-kd gelatinase-type IV collagenase equals gelatinase B) can degrate arterial elastin. *Am. J. Pathol.*, 1994, *145*, 1208-1218.

Knight C. G., Willenbrock F. & Murphy G., A novel coumarin-labelled peptide for sensitive continuous assays of the matrix metalloproteinase. *FEBS Lett.*, 1992, *296*, 263-266.

Laurell C.-B. & Eriksson S., The electrophoretic α_1-globulin pattern of serum in α_1-antitrypsin deficiency. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 1963, *15*, 132-140.

McRae B., Nakajima K., Travis J. & Powers J. C., Studies on reactivity of human leukocyte elastase, cathepsin G, and porcine pancreatic elastase toward peptides including sequences related to the reactive site of α_1-protease inhibitor (α_1-antitrypsin). *Biochemistry*, 1980, *19*, 3973-3978.

Nakajima K. & Powers J. C., Mapping the extended substrate binding site of cathepsin G and human leukocyte elastase. *J. Biol. Chem.*, 1979, *254*, 4027-4032.

Nishino N. & Powers J. C., *Pseudomonas aeruginosa* elastase. Development of a new substrate, inhibitors, and an affinity ligand. *J. Biol. Chem.*, 1980, *255*, 3482-3486.

Robert B., Szigeti M., Robert L., Legrand Y., Pignaud G. & Caen J., Release of elastolytic activity from platelets. *Nature*, 1970, *227*, 1248-1249.

Schechter I. & Berger A., On the size of proteinases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1967, *27*, 157-162.

Shipley J. M., Doyle G. A. R., Fliszar C. J., Ye Q.-Z., Johnson L. L., Shapiro S. D., Welgus H. G. & Senior R. M., The structural basis for the elastolytic activity of the 92-kDa and 72-kDa gelatinases. *J. Biol. Chem.*, 1996, *271*, 4335-4341.

Skiles J. W. & Jeng A. Y., Therapeutic promises of leukocyte elastase and macrophage metalloelastase inhibitors for the treatment of pulmonary emphysema. *Exp. Opin. Ther. Patents.* 1999, *9*, 869-895.

Takahashi S., Seifter S. & Yang F. C., A new radioactive assay for enzymes with elastolytic activity using reduced tritiated elastin, the effect of sodium dodecyl sulfate on elastolysis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, *327*, 138-145.