

**Année 2017-2018 - Demande d'allocation doctorale
ED Santé, Sciences Biologiques et Chimie du Vivant (SSBCV) n°549**

1. Informations administratives :

Nom de l'encadrant responsable de la thèse : [Lalmanach Gilles](#)
Unité : [Inserm UMR 1100 - Centre d'études des pathologies respiratoires \(CEPR\)](#)
Equipe : [Equipe 2 - Mécanismes protéolytiques dans l'inflammation](#)
Filière de rattachement : [Physiopathologie humaine et animale \(filière A\)](#)
Email de l'encadrant : gilles.lalmanach@univ-tours.fr

Co-encadrant éventuel (NB : limité à 1 seul co-encadrant(e)) :

2. Titre de la thèse : Impact de la surexpression de protéases, les cathepsines à cystéine, sur l'intégrité des barrières épithéliales lors de la BPCO (bronchopneumopathie chronique obstructive)

3. Résumé :

Contexte scientifique : Bien que peu connue du grand public, la BPCO est une pathologie chronique qui sera la 3^{ème} cause de mortalité dans le monde en 2020 (16 000 décès annuels en France). L'étiologie de la BPCO repose essentiellement sur l'inhalation de microparticules et d'agents irritants liés aux fumées de combustion (fumée de cigarette, fumées industrielles et domestiques), conduisant au développement d'une insuffisance respiratoire irréversible. Lors de la BPCO on observe une obstruction des voies aériennes (bronchite chronique) et une destruction des parois alvéolaires (emphysème), aggravée par des phases d'exacerbation (infections bactériennes ou virales). La perte irréversible des jonctions intercellulaires qui induit une altération de la barrière épithéliale serait, entre autres, associée à une inflammation chronique et un déséquilibre de la balance protéases/anti-protéases. Sachant qu'il n'existe à ce jour aucun traitement de la BPCO, le développement de thérapies innovantes constitue un enjeu majeur de santé publique.

Objectif général : Les cathepsines à cystéine (11 membres chez l'homme) sont des protéases lysosomales qui peuvent être sécrétées par les macrophages ou les cellules épithéliales en conditions physiopathologiques; elles constituent des cibles thérapeutiques potentielles lors de pathologies pulmonaires. Outre leurs propriétés collagénolytiques, ces enzymes sont impliquées dans la dégradation de protéines matricielles comme la fibronectine. Plusieurs protéines de jonctions (cadhérine-E, JAM-B) seraient aussi susceptibles à l'activité protéolytique des cathepsines lors de la BPCO. Dans ce contexte, nous avons commencé par évaluer les conséquences de l'exposition à la fumée de cigarette sur l'activité des cathepsines pulmonaires. Nous avons montré une surexpression des cathepsines (Cat) et en particulier une hypersécrétion de CatS tant dans les biopsies de patients BPCO que sur des cellules épithéliales exposées à la fumée de cigarette (CSE) (Andrault et al, en préparation). Notre objectif est maintenant d'analyser les conséquences de cette surexpression sur les altérations protéolytiques associées des protéines de jonction des barrières épithéliales.

Le sujet de thèse proposé s'articulera autour de plusieurs tâches complémentaires:

(A) Profil d'expression des protéines de jonction lors de la BPCO: Nous étudierons l'expression des protéines de jonction (occludine, cadhérines, claudines, JAMs, etc...) dans des échantillons humains - biopsies pulmonaires provenant de patients BPCO (n=50, stades 1-3) ou non-BPCO (n=48) - afin de dresser le profil différentiel des variations d'expression des protéines de jonction au cours des différentes phases de la BPCO.

(B) Conséquences de la surexpression des cathepsines sur l'intégrité des protéines de jonction:

Les cellules épithéliales (lignée 16HBE) seront exposées: (a) directement à de la CatS (apport exogène correspondant aux concentrations extracellulaires trouvées dans les échantillons BPCO), (b) à des extraits de fumée de cigarette (CSE) afin d'identifier les altérations des jonctions trans-épithéliales associées aux modifications d'expression et d'activité des cathepsines, et en particulier de la CatS. Les niveaux d'expression et l'intégrité structurale des protéines de jonctions seront analysés selon différentes approches immunochimiques et par protéomique. Cette dernière approche (analyses du protéome complet et du sécrétome) sera menée en collaboration avec le laboratoire du Dr Oliver Schilling (Institute of Molecular Medicine and Cell Research, University of Freiburg, Freiburg, Germany), où le(la) doctorant(e) effectuera un séjour de quelques mois. La validation de la contribution des cathepsines à cette altération des jonctions se fera grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques spécifiques et/ou par invalidation génique (siRNA - CRISPR Cas9).

(C) Conséquences physiopathologiques de l'altération protéolytique de la barrière épithéliale sur la perméabilité trans-épithéliale: Chez les sujets atteints de BPCO la diminution de l'intégrité de la barrière trans-épithéliale favoriserait en particulier l'invasion et l'infection du tissu pulmonaire par différents pathogènes conduisant à une exacerbation de l'inflammation. L'impact fonctionnel de la dégradation des protéines de jonction sera évalué via la mesure de l'intégrité des jonctions étanches épithéliales. Différentes mesures (résistance trans-épithéliale, impédance en temps réel, FITC-Dextran) seront effectuées sur les cellules 16HBE et des epithelia reconstitués traités par les cathepsines et par CSE (collaboration: INSERM UMR 1069, Nutrition, Croissance et Cancer). Les conséquences de cette perte d'étanchéité (i.e. perméabilité accrue aux pathogènes) seront analysées en présence de souches bactériennes de référence (*Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Haemophilus*).

Cette étude permettra d'identifier les principales protéines des jonctions serrées cibles des cathepsines (en particulier CatS) et de mieux appréhender l'impact fonctionnel de la surexpression de ces protéases sur l'intégrité et la perméabilité de la barrière trans-épithéliale lors de la BPCO. Cette étude devrait aussi fournir un argumentaire supplémentaire et rationnel justifiant l'émergence de nouvelles thérapies innovantes de la BPCO basée sur un ciblage spécifique par des anti-protéases. Les approches méthodologiques et savoir-faire nécessaires à ces travaux sont solidement établies et maîtrisées au sein du CEPR et pourront bénéficier du soutien des plateformes et plateaux techniques tourangeaux. Les moyens scientifiques complémentaires à la réalisation de ce projet sont disponibles localement (INSERM UMR 1069).

4. Résumé en anglais : Impact of overexpression of proteases, cysteine cathepsins, on the integrity of epithelial barriers in COPD (Chronic Obstructive Pulmonary Disease)

Scientific context: COPD is a chronic pathology that will be the 3rd leading cause of death in the world in 2020 (16,000 annual deaths in France). The etiology of COPD is essentially based on the inhalation of microparticles and irritants associated with combustion fumes (cigarette smoke, industrial and household emissions), leading to the development of irreversible respiratory failure. During COPD there is obstruction of the airways (chronic bronchitis) and destruction of the alveolar walls (emphysema), aggravated by exacerbation phases (bacterial or viral infections). The irreversible loss of intercellular junctions that induces epithelial barrier alteration is associated with chronic inflammation and an imbalance in the protease/antiprotease balance. Knowing that there is currently no treatment for COPD, the development of innovative therapies is a major public health issue.

General purpose: Cysteine cathepsins (11 members in humans) are lysosomal proteases that can be secreted by macrophages or epithelial cells under physiopathological conditions; they constitute potential therapeutic targets during pulmonary pathologies. In addition to their collagenolytic properties, these enzymes are involved in the degradation of matrix proteins such as fibronectin. Several junction proteins (E-cadherin, JAM-B) would also be susceptible to the proteolytic activity of cathepsins. In this context, we began by evaluating the consequences of exposure to cigarette smoke on the activity of pulmonary cathepsins. Cathepsin (Cat) overexpression and, in particular, CatS hypersecretion were observed in biopsies of COPD patients as well as on epithelial cells exposed to cigarette smoke (CSE) (Andrault et al, in preparation). Our goal now is to analyze the consequences of this overexpression on the associated proteolytic alterations of proteins joining the epithelial barriers within zonulae occludentes.

The proposed study will be organized around several complementary tasks:

(A) Expression profile of tight junction proteins during COPD: We will study the expression of major junction proteins (occludin, cadherins, claudins, JAMs, etc.) in human samples - pulmonary biopsies from COPD patients (n = 50, stages 1-3) or non-COPD (n = 48) - in order to profile the expression variations of these proteins during the different stages of COPD.

(B) Consequences of overexpression of cathepsins on the integrity of the junction proteins: Epithelial cells (cell line: 16HBE) will be exposed: (a) to CatS (addition of exogenous CatS corresponding to the extracellular concentrations found in the COPD samples), (b) to cigarette smoke extracts (CSE) to identify alterations in trans-epithelial junctions associated with changes in expression and activity of cathepsins. The expression levels and structural integrity of the junction proteins will be analyzed according to different immunochemical and proteomic approaches. The latter approach (analysis of both "full proteome" and secretome) will be conducted in collaboration with Dr. Oliver Schilling (Institute of Molecular Medicine and Cell Research, University of Freiburg, Freiburg, Germany), where the PhD student will stay 2-3 months. Validation of the contribution of cathepsins to the alteration of the tight junctions will be done through the use of specific pharmacological inhibitors and/or by gene invalidation (siRNA - CRISPR Cas9).

(C) Pathophysiological consequences of proteolytic impairment of the epithelial barrier on trans-epithelial permeability: The decrease in the integrity of the trans-epithelial barrier may promote invasion and infection of pulmonary tissues by different pathogens leading to an exacerbation of inflammation in COPD patients. The functional impact of the impairment of junction proteins will be assessed by analysis of the tightness of epithelial cells: measurements (trans-epithelial resistance, real-time impedance, FITC-Dextran) will be performed on 16HBE cells and reconstituted epithelia treated with cathepsins and with CSE (collaboration: INSERM UMR 1069, Nutrition, Growth & Cancer). The consequences of this leakage (i.e. increased permeability to pathogens) will be analyzed in the presence of reference bacterial strains (*Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Haemophilus*).

This study aims to identify the main tight junction proteins targeted by cathepsins (especially CatS) and to better understand the functional impact of overexpression of these proteases on the integrity and permeability of the trans-epithelial barrier during COPD. This study should also provide an additional and rational claim justifying the emergence of state-of-the-art therapies for COPD based on specific targeting with anti-proteases. The methodological approaches and know-how necessary for this study are firmly established and mastered within the lab. We will also benefit from the support of the technical platforms and facilities of Tours, and additional scientific means to carry out this project are available locally (INSERM UMR 1069).