

Défensines

Paul M. Tulkens



- Unité de pharmacologie cellulaire et moléculaire, Université catholique de Louvain (UCL), Brussels
<http://www.md.ucl.ac.be/facm>

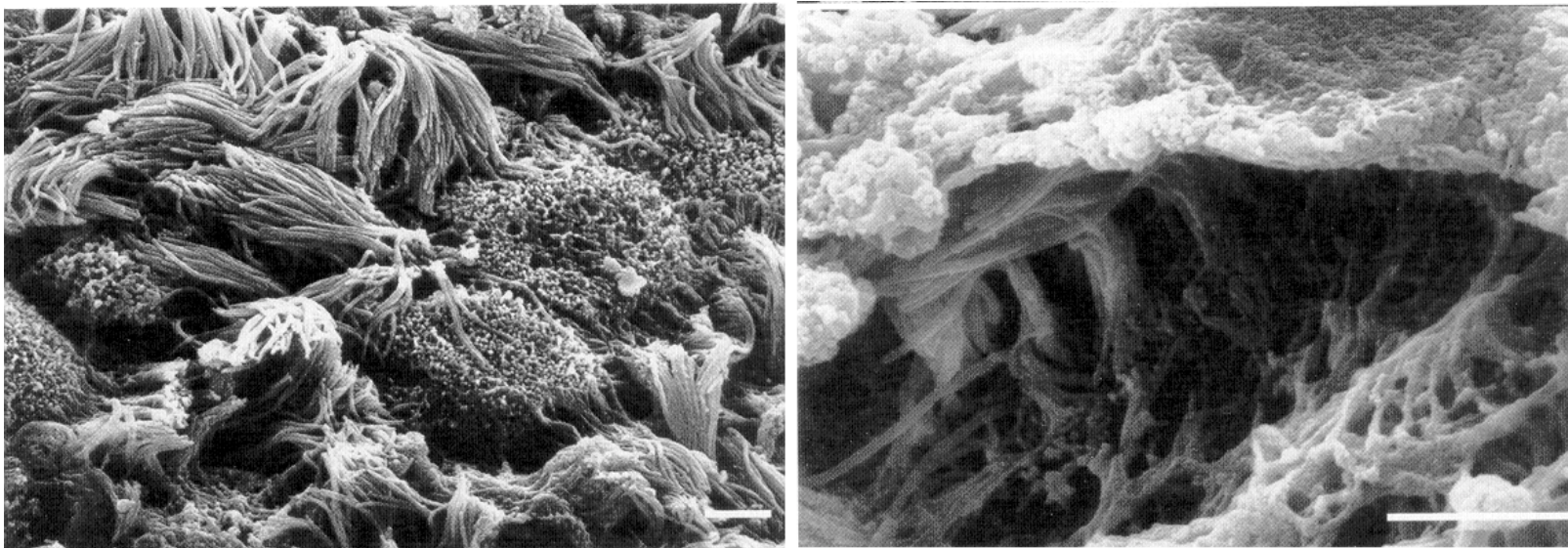


- International Society of Antiinfective Pharmacology (ISAP)
<http://www.isap.org>

Mucoviscidose et infection pulmonaire

- **Pourquoi des infections pulmonaires fréquentes chez le patient atteint de mucoviscidose ?**
- **Peut-on les prévenir ?**

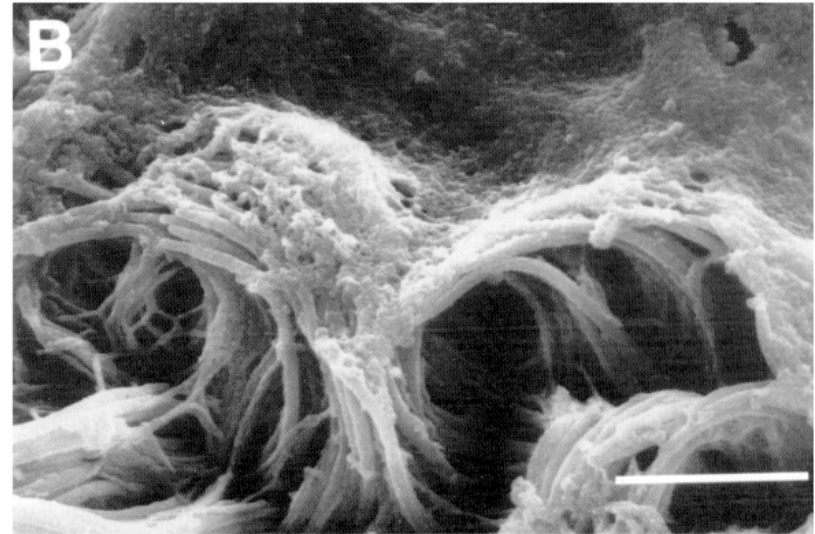
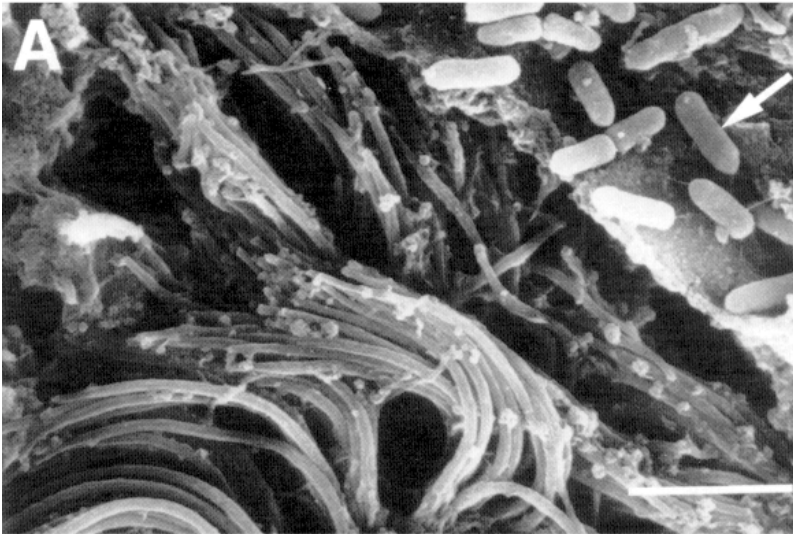
Morphologie des cellules épithéliales bronchiques normales



Photographies en microscopie électronique à balayage de la surface apicale de cellules épithéliales de voies aériennes de sujet normal 41 jours après la mise en culture (la barre indique 3 μm)

J.J. Smith et al., Cell 85:229-236,1996

Morphologie des cellules épithéliales bronchiques de patient mucoviscidosique



Photographies en microscopie électronique à balayage de la surface apicale de cellules épithéliales de voies aériennes de sujet atteint de mucoviscidose après addition de *Ps.*

Aeruginosa. La persistance de bactéries à la surface des cellules est bien visible (barre: 3 μ m)

J.J. Smith et al., Cell 85:229-236,1996

Pourquoi des infections pulmonaires fréquentes chez le patient atteint de mucoviscidose ?

Hypothèse...

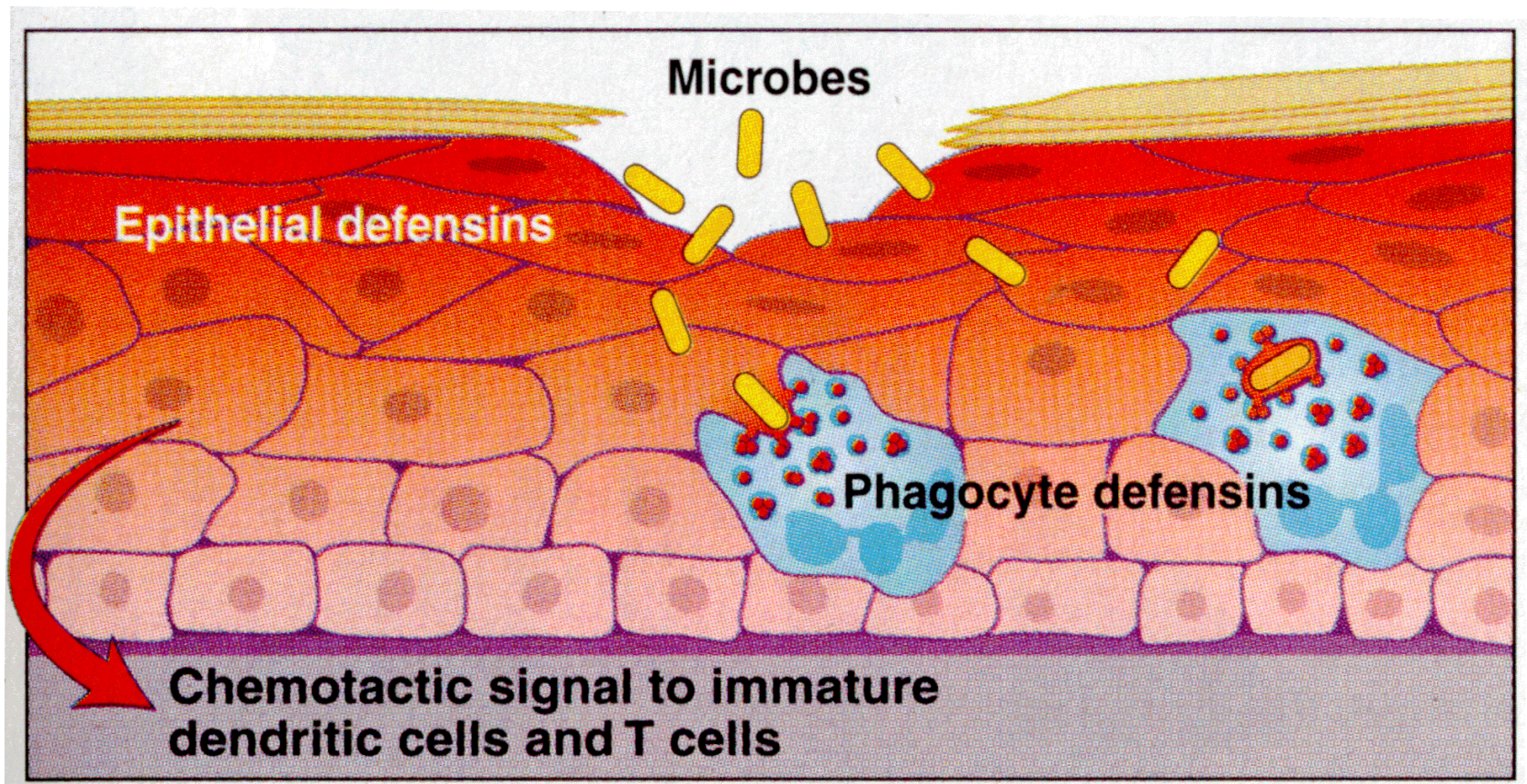
- ***deshydratation du mucus***
 - ***sécrétion collantes***
 - ***clairance diminuée***
- ***anomalie de composition du mucus***
 - ***adhérence accrue des micro-organismes***
- ***colonisation anormale***
 - ***cercle vicieux inflammation / obstruction / destruction***

physique

biochimique

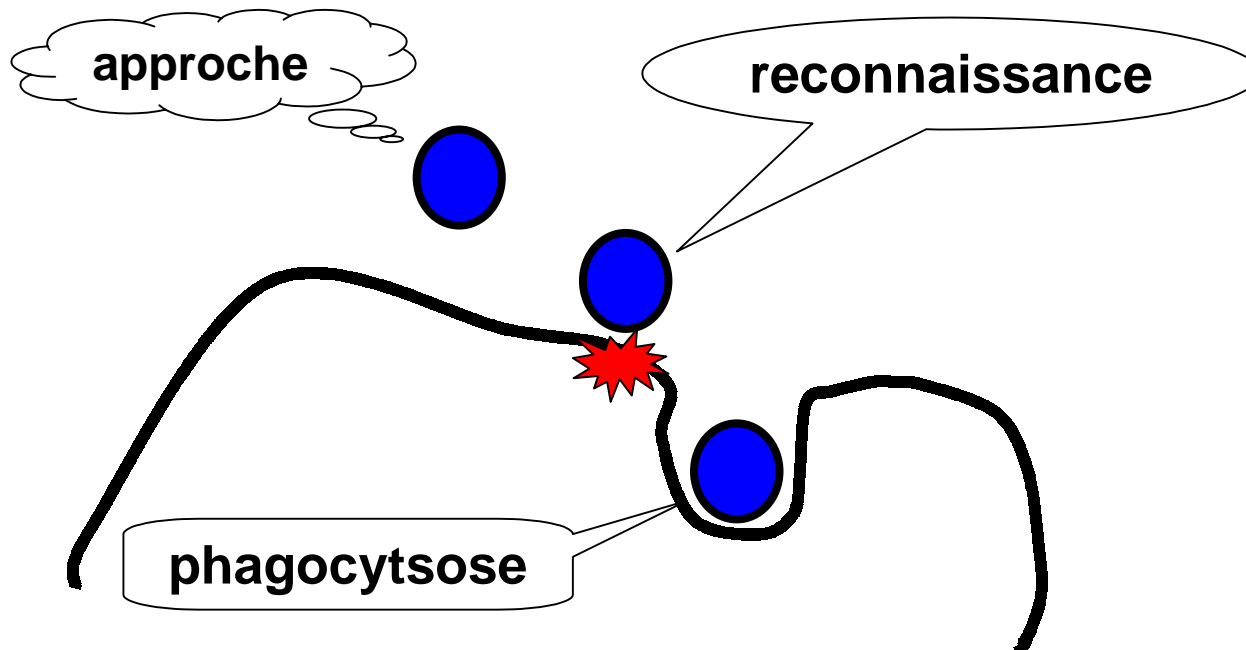
microbiologique

Défense des épithelia



Science, 1999

Les premiers stades de la capture bactérienne

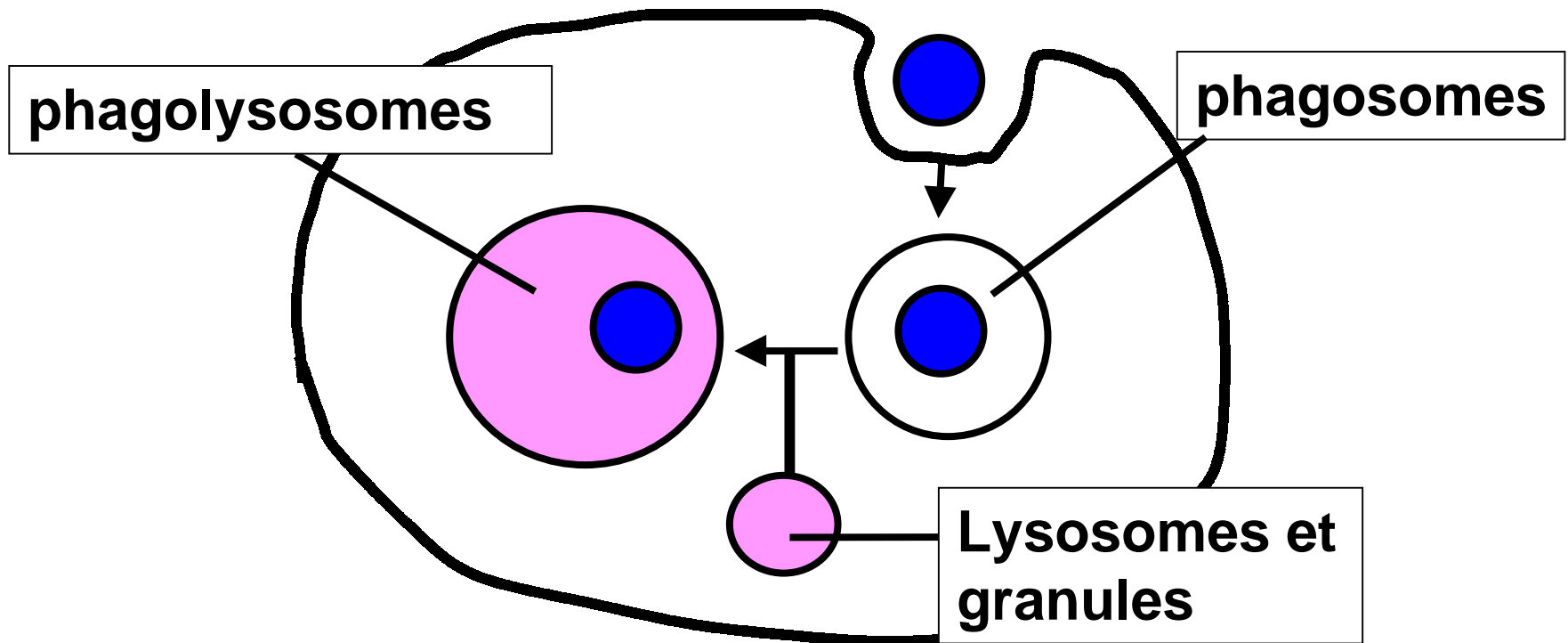


Les premiers stades de la capture bactérienne

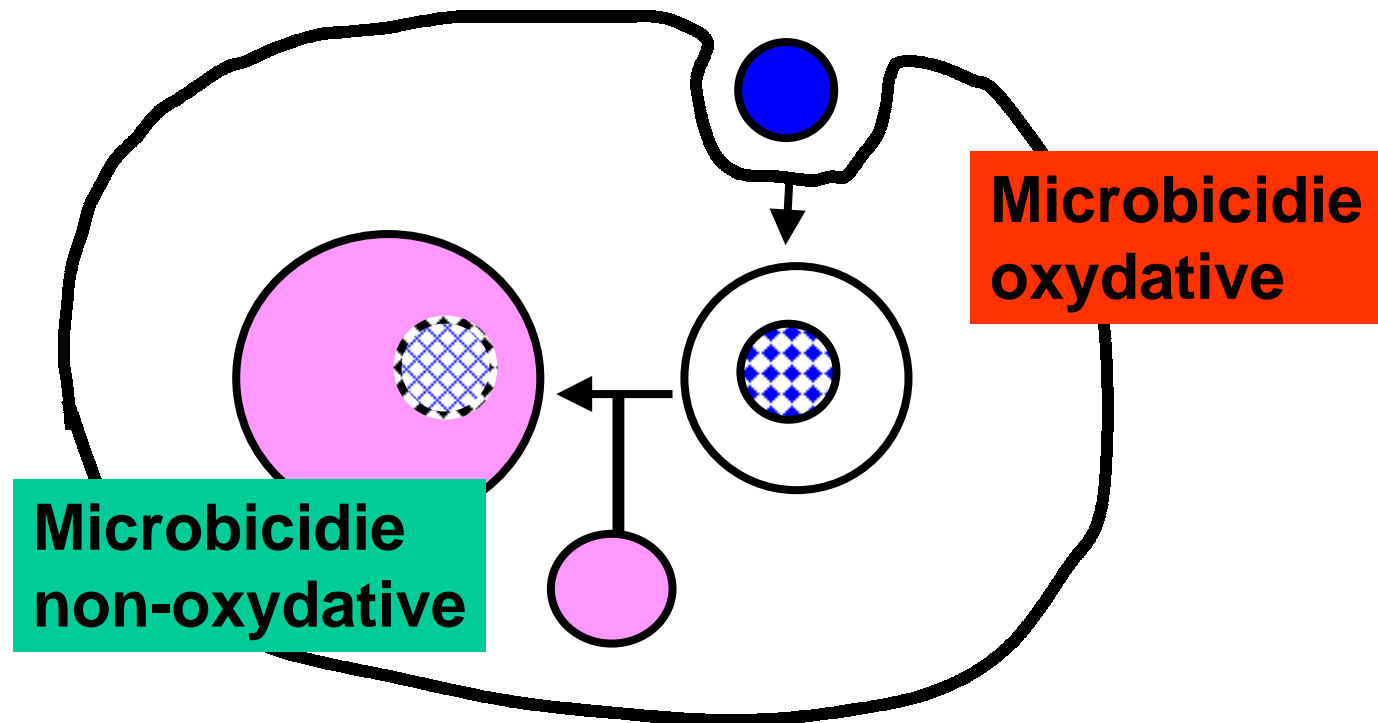


<i>Fonction</i>	<i>Récepteur</i>	<i>Ligand</i>	<i>Source</i>
Approche (Chemotaxis)	C3bi	C3bi	serum cell.endotheliales
Adhérence	FMLP	f-met	bactéries
	LTB₄	peptides	macrophages
	C5_a	LTB₄ C5_a des-arg	serum
Phagocytose	Fc	IgG	sérum immun
	C3bi	C3bi	sérum

Sort intracellulaire des micro-organismes

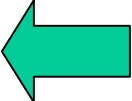


Destruction intracellulaire des micro-organismes



Mécanismes de la microbicidie non-oxydative



<i>Composant</i>	<i>Masse mol. molécul.</i>	<i>Localisation</i>	<i>Concentr. (µg/g)</i>
Lysozyme	14.4	gr.azuroph. et gr. spéc.	3
Lactoferrine	80	gr.spécif.	2-6
BPI	58	gr. azuroph.	< 1
Cathepsin G	25 - 29	gr. azuroph.	1-2
Defensines	3.6 - 4	gr.azuroph.	4-6 

Nature des défensines

- peptides de 29 à 34 résidus

➡ *petites protéines (insuline = 51 résidus)*

- riches en arginines

➡ *caractère basique* ➡ *amphiphile*

- purifiés à partir des polymorphonucléaires neutrophiles et des cellules épithéliales chez le lapin, le cobaye, et l'homme

Spectre antibactérien des défensines



- **Bactéries Gram(+)**
 - **S. aureus**
 - Strept. gr. B
 - Listeria m.
- **Germes anaréobies**
 - Bacteroides fragilis
 - Clostridium difficile
- **Champignons**
 - Candida spp.
 - Aspergillus
 - Cryptococcus
 - Coccidiosis i.
- **Bactéries Gram (-)**
 - **Pseudomonas aeruginosa**
 - Acinetobacter spp.
 - Escherichia coli
 - Proteus mirabilis
 - **Hemophilus influenzae**
 - Salmonella typhimurium
- **Virus**
 - Herpes simplex 1 et 2
 - Influenza A
 - V.S.V

Classification des défensines

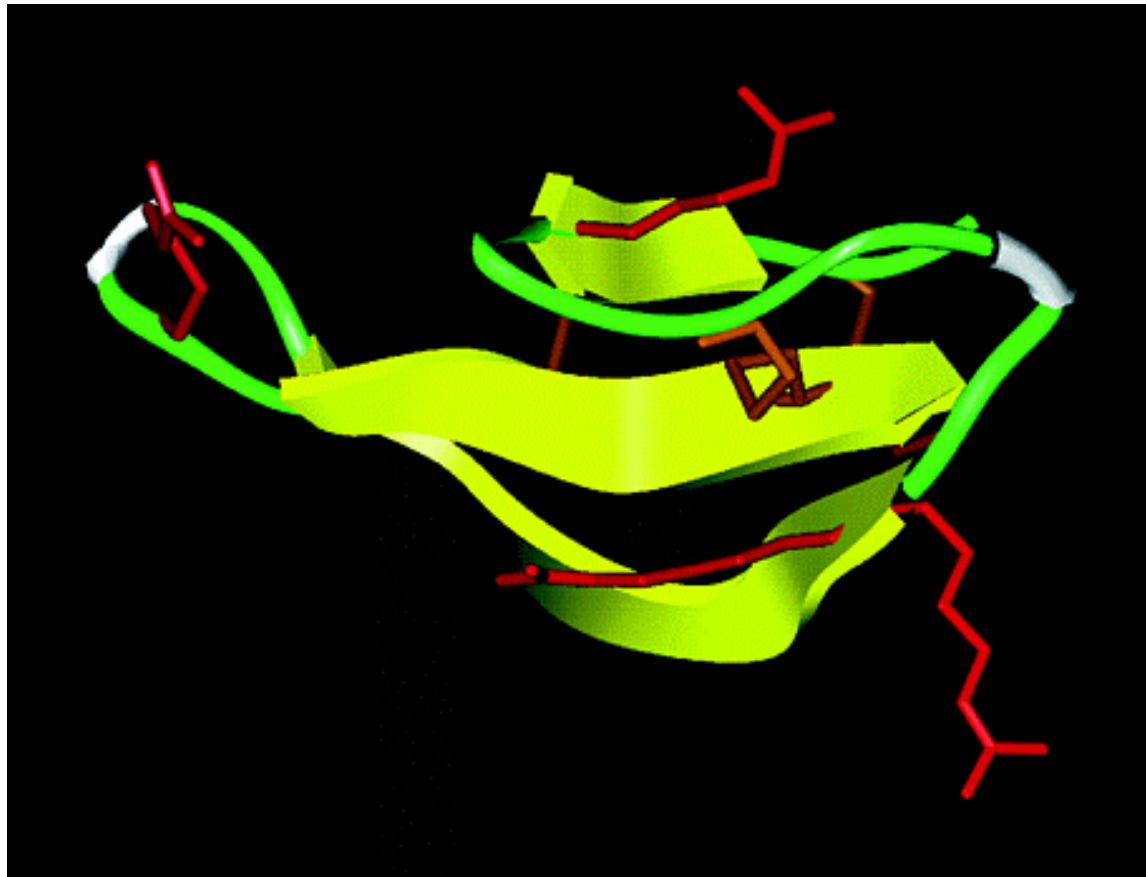
- **α -défensines**

- “human neutrophil peptides” (HNP)
- polymorphonucléaires neutrophiles (6 types décrits: HNP1-6)
- produits de façon constitutive 25-35 résidus
- organisation en feuillets β antiparallèles stabilisés par des ponts disulfures

- **β -défensines**

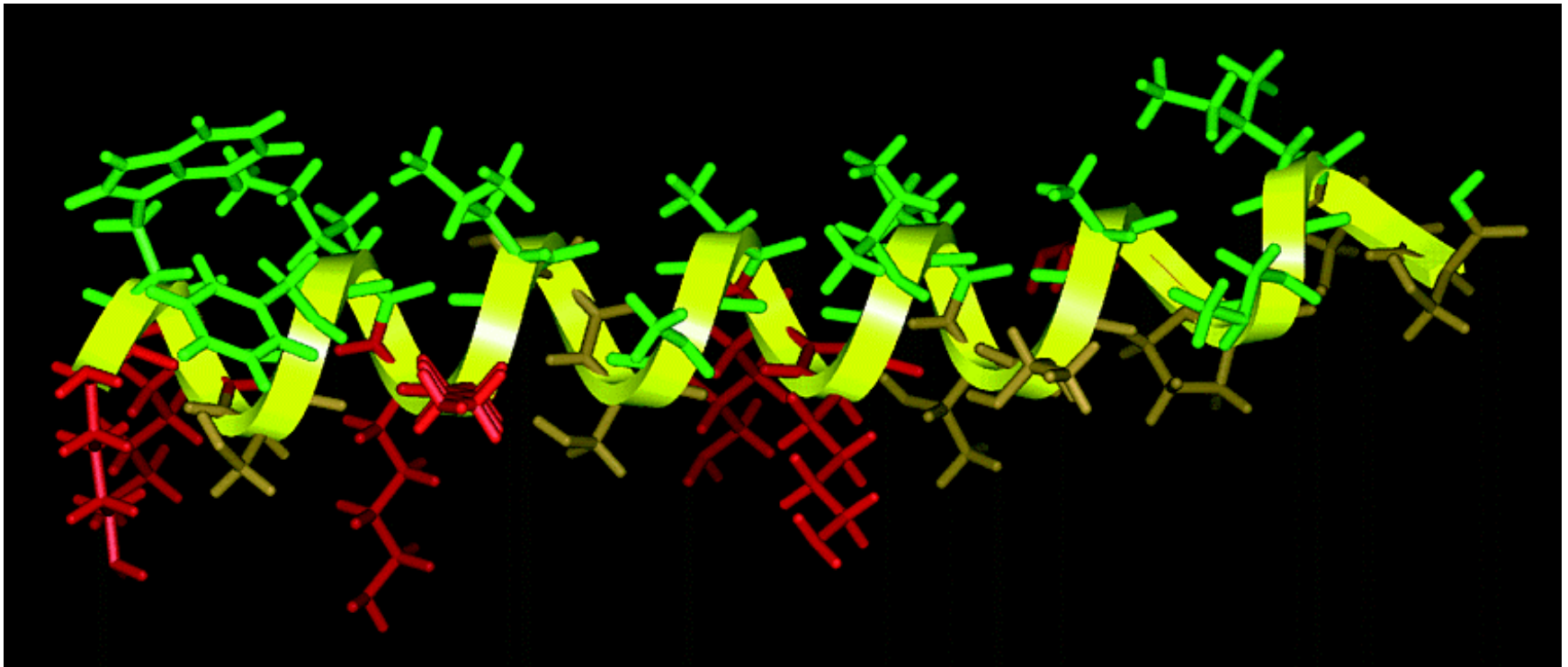
- “human beta defensins” (HBD); 2 types décrits (HBD1-2)
- organisation “semblable” à celle des α -défensines (?)
- HBD2 produit de façon inductible (infection) dans les épithélia (TNF- α , IL-1- β , bactéries Gram (-) [*LPS-inducible*])

Organisation en feuillet β



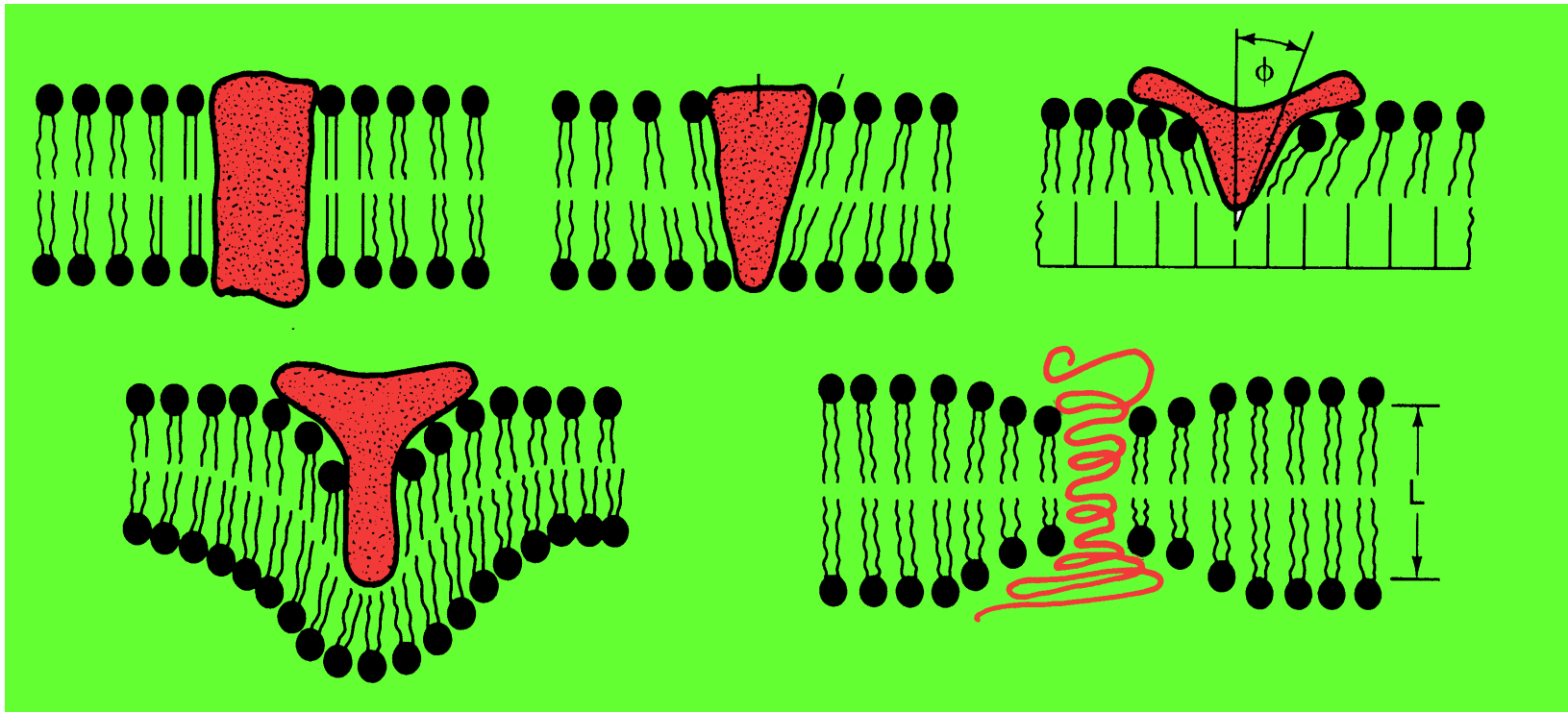
Hancock et al., 1998

Organisation en hélice amphipathique



Hancock et al., 1998

Destabilisation de la membrane par insertion de protéines



Distribution tissulaire des β - défensines



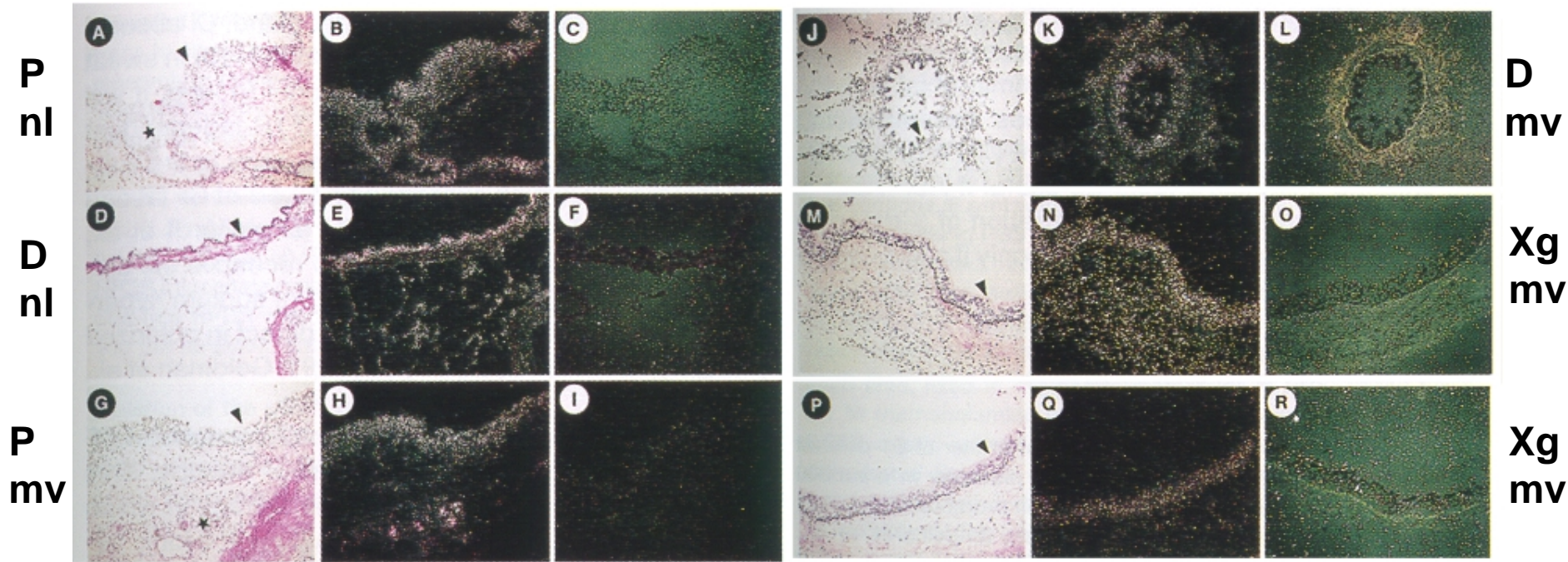
Tissu

peau poumon trachée intestin salive tractus ur.-gén. utérus rein foie

HBD1	+	+	+	++	+	++++	+	++++	+
HBD2	++++ ^a	++++ ^a	++++ ^a		(+)	+	+		

^a uniquement après induction pro-inflammatoire
(y compris les patients mucoviscidosiques)

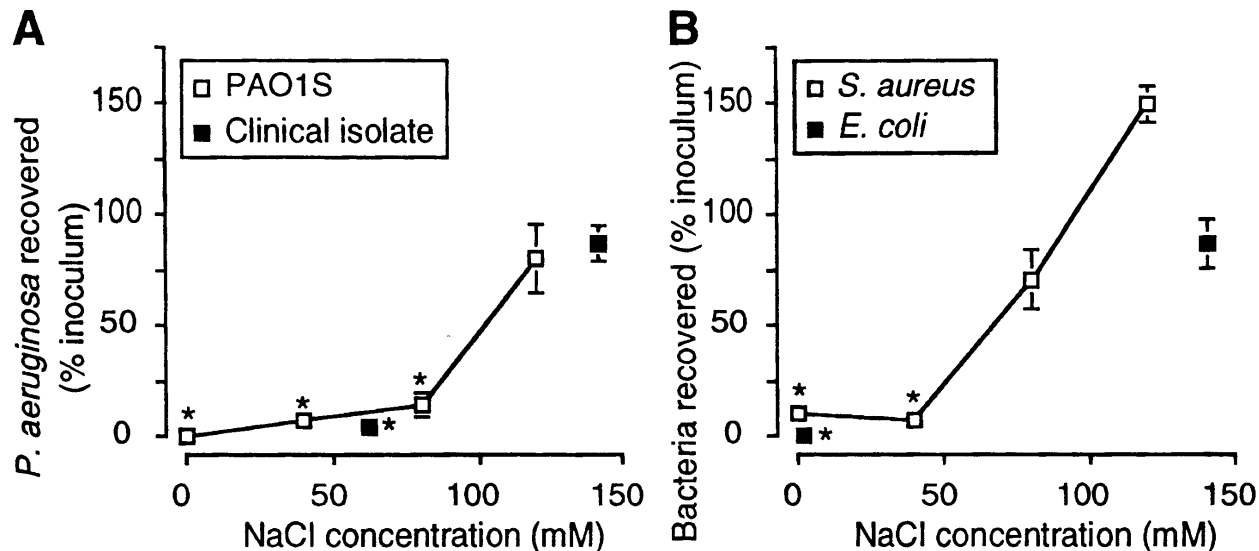
Expression des défensines dans des cultures in vitro



Détection des mRNA de la défensine HBD. L'expression des défensines HBD1 n'est pas différente entre sujet normal et sujet mucoviscidosique...

Goldman et al., Cell 88:553-560, 1997

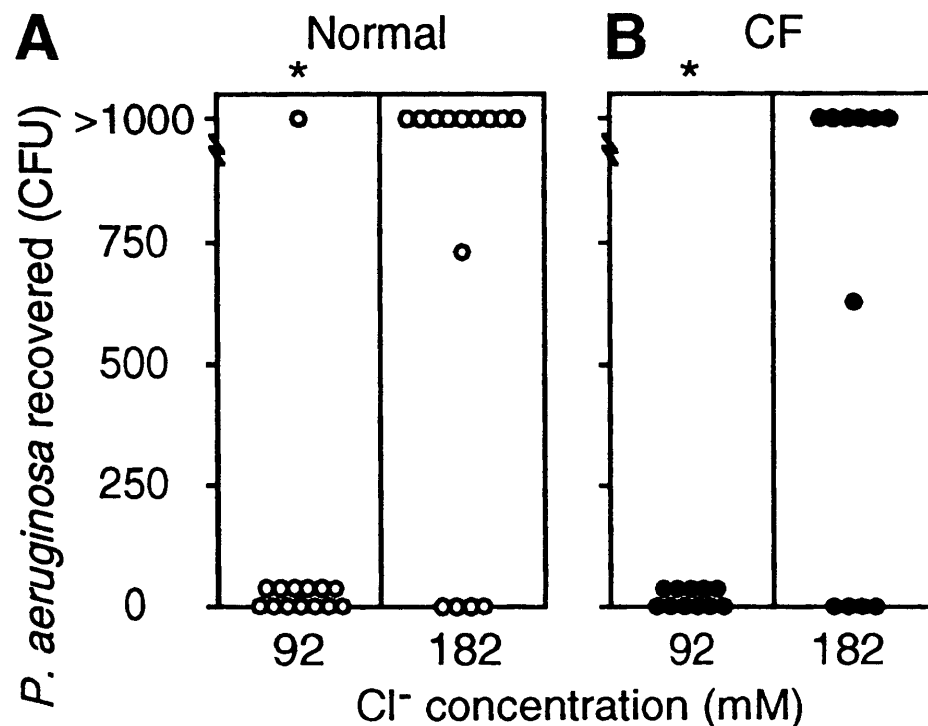
Influence du chlorure de sodium (NaCl) sur l'activité des défensines



Mais l'activité des défensines (fluide de surface) est inhibée par les hautes concentrations en chlorure de sodium...

J.J. Smith et al., Cell 85:229-236,1996

Influence du chlorure de sodium (NaCl) sur l'activité des défensines



Seule la concentration élevée de chlorure de sodium est responsable de la perte d'activité des défensines...

J.J. Smith et al., Cell 85:229-236,1996

Aspects négatifs des défensines...

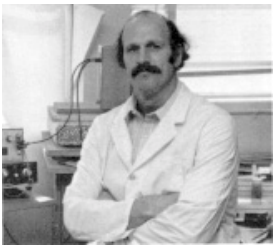
- Les défensines sont inactives dans le mucus des patients mucoviscidosiques
- La stimulation des épithélia par l'IL-2 β ne donne pas de différence majeure dans l'expression de l'HBD-2
- Les défensines altèrent l'intégrité des épithélia, augmentent la production de mucus, réduisent les mouvements ciliaires et induisent la formation de médiateurs qui augmentent l'inflammation (ceci joue sans doute un rôle pathologique dans les pneumonies)

Mais les défensines ne sont pas la seule possibilité...

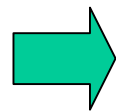


Antibiotiques peptidiques en 1999 ...

Rabbit defensin (NP-1)	VVC ₁ AC ₂ RRALC ₃ LPRERRAGFC ₃ RIRRGRIHLC ₂ C ₁ RR
Crab tachyplesin	RRWC ₁ FRVC ₂ YRGFC ₂ YRKC ₁ R
Bovine bactenecin	RLC ₁ RIVVIRVC ₁ R
Silk-moth cecropin A	KWKFKKIEKMGRNIRDGIVKAGPAIEVIGSAKAI
Bovine indolicidin	ILPWKWPWWPWR
Bacterial nisin	IXA ₁ IULA ₁ Z ₂ PGA ₂ KZ ₃ GLAMGA ₃ NMKZ ₄ AZ ₅ A ₄ HA ₅ SIHVUK



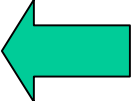
Hancock et al., 1998



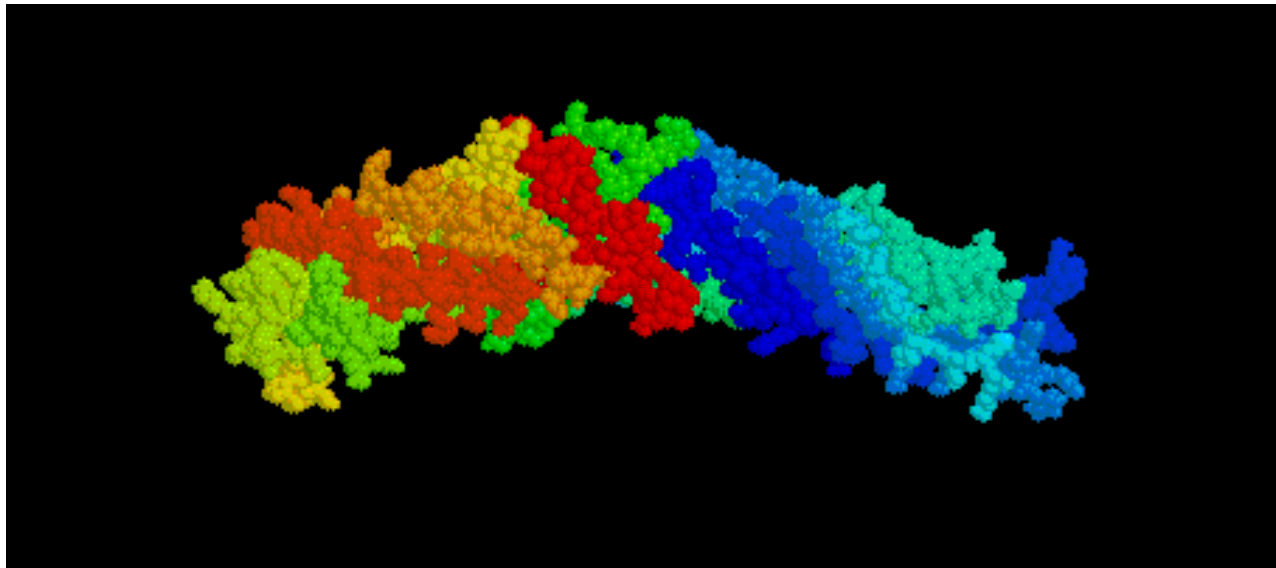
Mécanisme “universel” de défense ??

Mécanismes de la microbicidie non-oxydative



<i>Composant</i>	<i>Masse mol. molécul.</i>	<i>Localisation</i>	<i>Concentr. (µg/g)</i>
Lysozyme	14.4	gr.azuroph. et gr. spéc.	3
Lactoferrine	80	gr.spécif.	2-6
BPI	58	gr. azuroph.	< 1 
Cathepsin G	25 - 29	gr. azuroph.	1-2
Defensines	3.6 - 4	gr.azuroph.	4-6

La BPI, une protéine augmentant la perméabilité bactérienne ...



Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI), a potent antimicrobial protein of 456 residues, binds to and neutralizes lipopolysaccharides from the outer membrane of Gram-negative bacteria. At a resolution of 2.4 angstroms, the crystal structure of human BPI shows a boomerang-shaped molecule formed by two similar domains. Two apolar pockets on the concave surface of the boomerang each bind a molecule of phosphatidylcholine, primarily by interacting with their acyl chains; this suggests that the pockets may also bind the acyl chains of lipopolysaccharide. As a model for the related plasma lipid transfer proteins, BPI illuminates a mechanism of lipid transfer for this protein family.

From L. Beamer, Johns Hopkins University, Baltimore, Md
(<http://www.biochem.missouri.edu/~lesa/BPI/BPI.html>)

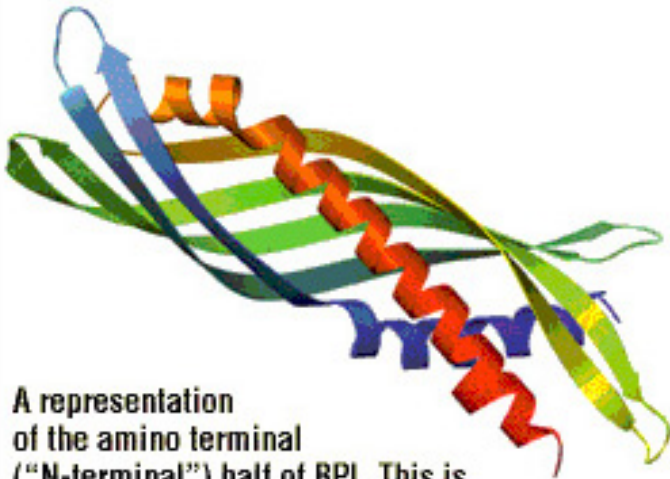


Vers des essais cliniques ?



1995:

What about XOMA's peptides? Screening peptides for antimicrobials is a brilliant idea, but we will have to see what happens in that search. This new BPI-derived peptide compound appears to be very active in vitro and in vivo against *Candida* and other fungi. Such data on a peptide derived from a compound that is already being given to humans with relatively low toxicity shows great promise (Jack Remington, M.D., Stanford University, Cal.)



A representation of the amino terminal ("N-terminal") half of BPI. This is the portion of the molecule from which rBPI-21 (Neuprex™ and I-PREX™) is derived.

Mars 2000

NEUPREX®, XOMA's first recombinant BPI-derived product, completed a Phase III trial in severe pediatric meningococemia in May 1999 and is in Phase I for cystic fibrosis patients (15 patients)