

## **Applications biologiques**

### **III-B.1. Peptidome de base du *stratum corneum***

*Protocoles de référence :*

Préparation des échantillons non digérés : **V-A.1.2.** p.145, **V-A.1.3.** p.145, **V-A.1.4.** p.146

Expérience LC-MS/MS : **V-A.3.1. b** p.148, **V-A.5.2.** p.153

Recherche dans les banques et validation : **V-A.6.1. a** p.154, **V-A.6.2. b** p.155

#### **III-B.1.1. Identification des peptides**

Pour étudier le dégradome de base du *stratum corneum*, nous avons développé une stratégie basée sur l'ultrafiltration, la reconcentration sur phase solide et l'analyse par LC-MS/MS des échantillons. Dans les études peptidomiques, **l'ultrafiltration** par centrifugation est la méthode la plus utilisée pour extraire des

peptides et éliminer les protéines de haut poids moléculaire [6, 221, 222]. Cette technique exploite un mécanisme d'exclusion stérique grâce à des membranes de seuil d'exclusion spécifique. Ainsi Zheng *et al.* ont utilisé cette procédure sur des échantillons de sérum et ont identifié 350 peptides endogènes uniques provenant de 61 protéines [223]. Nous avons également utilisé l'ultrafiltration en tant qu'étape de pré-fractionnement. Combiner des membranes d'ultrafiltration de différents seuils (10kDa et 5kDa) nous permet de séparer les peptides en différentes fractions, ce qui augmente la sensibilité de nos identifications. Cependant, de la même manière que cette étape permet de concentrer les composés d'intérêt, les contaminants sont eux aussi concentrés. Leur présence peut réduire drastiquement les performances d'analyse des peptides par spectrométrie de masse. C'est pourquoi, nous avons ajouté une étape de **reconcentration** des peptides sur phase solide de type ZipTip™ C18, ce qui permet également de dessaler l'échantillon. Enfin l'utilisation d'une **séparation chromatographique** préliminaire avant l'analyse par spectrométrie de masse est nécessaire pour les études d'échantillons complexes en particulier dans les approches peptidomiques : comme l'échantillon n'est pas digéré à la trypsine, certaines protéines ne seront identifiées que grâce à très peu de peptides, voire un seul. Les analyses MS ont été réalisées sur un instrument hybride LIT-FTICR. Ce type d'appareil nous a permis à la fois de monter en sensibilité et en gamme dynamique afin d'identifier des peptides minoritaires. De plus, la masse des précurseurs est mesurée précisément dans la cellule ICR pendant le *scan* SIM. Les recherches dans les banques sans digestion *in silico* sont compensées en diminuant la tolérance de masse à 10ppm. Ainsi le nombre de faux positifs est significativement réduit et les identifications sont plus sûres.

Nous avons analysé des **extraits de peptides endogènes** de deux types d'échantillons différents : du *stratum corneum* plantaire où le phénomène de desquamation est moins complet et du *stratum corneum* non plantaire obtenu à partir de prélèvements non invasifs (*stripping*) au niveau de la jambe. Au total, **1098 séquences d'acides aminés différentes** ont été identifiées, appartenant à **71 protéines** (voir le Tableau 10). 21 de ces protéines sont de masse inférieure à 30kDa et peuvent être classifiées comme des protéines de bas poids moléculaire, comme par exemple la cystatine A, la caspase 14, la suprabasine ou encore la calmoduline-like 5. La **composition en peptides** des deux types d'échantillons est relativement différente. Ainsi certaines protéines ne sont détectées que dans les échantillons de *stratum* non plantaire comme la filaggrine 2 et au contraire d'autres comme la *fatty acid-binding protein* ne sont détectées que dans les échantillons de *stratum* plantaire. De plus lorsqu'une protéine est présente dans les deux échantillons, les peptides identifiés peuvent être partiellement différents.

La plupart des protéines identifiées peuvent être divisées en **4 classes fonctionnelles** : les protéines structurelles de l'épiderme, les enzymes, les inhibiteurs de protéases et les protéines d'adhésion.

Parmi les **protéines structurales**, se trouvent bien évidemment les **kératines** qui représentent 80% des protéines totales des cornéocytes [128].

Parmi les **enzymes** mises en évidence, se trouve par exemple la **caspase 14** impliquée dans les phénomènes d'inflammation ou d'apoptose mais aussi dans la prolifération, la différenciation et la cornification [224]. Cette enzyme présente un profil d'expression unique parmi les membres de la famille des caspases puisqu'elle est principalement présente dans les épithéliums cornifiés [225]. Dans la peau, la caspase 14 est uniquement exprimée dans les couches différenciées et cornifiées et dans le follicule pileux [226]. Les procaspases sont constituées d'un prodomaine, d'une grande sous-unité p20 et d'une petite sous-unité p10. Leur activation est induite par dimérisation et (auto)-clivage protéolytique. Contrairement aux autres caspases qui sont processées au niveau d'un résidu aspartate, la caspase 14 l'est au niveau d'un site atypique entre l'Ile152 et la Lys153 [227]. Or nos données ont mis en évidence plusieurs peptides endogènes de caspase 14 avec la Lys153 en N-terminal. En particulier le peptide  $^{153}\text{KDSPQTIPTYTDALHV}^{168}$  est le peptide le plus souvent identifié dans les échantillons de *stratum* non plantaire ce qui n'est pas le cas dans les échantillons de *stratum* plantaire où le peptide le plus identifié est le peptide  $^{87}\text{MAHGREGFLKGEDGEMVKLENL}^{108}$  du prodomaine ou de la grande sous-unité. Cette différence pourrait être due à une **activation de la caspase 14 différente** selon le type d'échantillon.

Parmi les **inhibiteurs** de protéases identifiés, on trouve la **cystatine A**. Inhibiteur de protéases à cystéine, il s'agit d'une des protéines précurseurs de l'enveloppe cornifiée des kératinocytes et cette protéine est exprimée durant la dernière étape de différenciation des kératinocytes. Dans nos analyses, nous avons mis en évidence différents peptides tout au long de la séquence. En particulier, l'un des peptides endogènes les plus observés correspond au fragment  $^2\text{IPGGLSEAKPATPEIQE}^{18}$ . Or il a été montré que la délétion des 8 premiers acides aminés de la cystatine amenait à sa complète inactivation [228]. Il est donc possible que la présence du peptide 2-18 dans nos extraits soit la trace de l'inactivation de cet inhibiteur.

**Tableau 10 : Protéines dont des peptides endogènes ont été identifiés dans des échantillons de peau par nanoLC-MS/MS. Combinaison des résultats des fractions inf 5kDa et 5-10kDa.**

**SCP : *stratum corneum* plantaire ; PA : poudre acétonique de *stratum corneum* non plantaire. # peptides et score en gras : au moins un peptide spécifique de la protéine dans l'échantillon. # peptides et score en italique : aucun peptide identifié en triplicat dans l'échantillon.**

N°Swissprot	Nom de la protéine	MW kDa	Score		# séquences a.a. uniques	
			SCP	PA	SCP	PA
K1C9	Keratin, type I cytoskeletal 9	62	<b>4745</b>	<b>568</b>	<b>67</b>	<b>7</b>
DMKN	Dermokine	47	<b>4030</b>	<b>964</b>	<b>66</b>	<b>13</b>
K2C1	Keratin, type II cytoskeletal 1	66	<b>3014</b>	<b>2058</b>	<b>46</b>	<b>31</b>
DESP	Desmoplakin	332	<b>2698</b>	<b>2537</b>	<b>50</b>	<b>46</b>

DSG1	Desmoglein-1	114	<b>2517</b>	<b>2687</b>	<b>49</b>	<b>47</b>
DSC1	Desmocollin-1	100	<b>2213</b>	<b>2679</b>	<b>45</b>	<b>52</b>
G3P	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36	<b>1874</b>	<b>2394</b>	<b>36</b>	<b>45</b>
CDSN	Corneodesmosin	51	<b>2358</b>	<b>1690</b>	<b>40</b>	<b>28</b>
K22E	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal	66	<b>153</b>	<b>2112</b>	<b>4</b>	<b>37</b>
K1C10	Keratin, type I cytoskeletal 10	59	<b>300</b>	<b>2050</b>	<b>5</b>	<b>27</b>
CYTA	Cystatin-A	11	<b>1831</b>	<b>951</b>	<b>36</b>	<b>19</b>
FILA2	Filaggrin-2	248	0	<b>1532</b>	0	<b>26</b>
CALL5	Calmodulin-like protein 5	16	<b>1485</b>	<b>383</b>	<b>26</b>	<b>7</b>
K2C6A	Keratin, type II cytoskeletal 6A	60	<b>1442</b>	<b>159</b>	<b>25</b>	<b>3</b>
K2C6C	Keratin, type II cytoskeletal 6C	60	<b>1298</b>	<b>159</b>	<b>23</b>	<b>3</b>
K2C5	Keratin, type II cytoskeletal 5	62	<b>1264</b>	<b>831</b>	<b>22</b>	<b>15</b>
DSC3	Desmocollin-3	100	<b>515</b>	<b>1210</b>	<b>11</b>	<b>27</b>
K2C6B	Keratin, type II cytoskeletal 6B	60	<b>1094</b>	<b>81</b>	<b>19</b>	<b>2</b>
ARGI1	Arginase-1	35	<b>439</b>	<b>1041</b>	<b>9</b>	<b>21</b>
FILA	Filaggrin	435	<b>287</b>	<b>985</b>	<b>8</b>	<b>27</b>
SBSN	Suprabasin	25	<b>958</b>	<b>160</b>	<b>19</b>	<b>3</b>
CASPE	Caspase-14	28	<b>441</b>	<b>945</b>	<b>11</b>	<b>21</b>
TGM3	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase E	77	<b>368</b>	<b>922</b>	<b>9</b>	<b>23</b>
KPYM	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	58	<b>911</b>	<b>161</b>	<b>21</b>	<b>3</b>
K1C16	Keratin, type I cytoskeletal 16	51	<b>874</b>	<b>150</b>	<b>14</b>	<b>3</b>
ANXA2	Annexin A2	39	<b>234</b>	<b>857</b>	<b>5</b>	<b>22</b>
CATA	Catalase	60	<b>384</b>	<b>680</b>	<b>8</b>	<b>14</b>
BLMH	Bleomycin hydrolase	53	<b>303</b>	<b>653</b>	<b>4</b>	<b>12</b>
HORN	Hornerin	282	<b>587</b>	0	<b>9</b>	0
CYTM	Cystatin-M	17	0	<b>478</b>	0	<b>9</b>
FABP5	Fatty acid-binding protein, epidermal	15	<b>439</b>	0	<b>9</b>	0
ALBU	Serum albumin	69	<b>373</b>	0	<b>8</b>	0
HUTH	Histidine ammonia-lyase	73	0	<b>336</b>	0	<b>7</b>
PEBP1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	21	<b>301</b>	<b>302</b>	<b>7</b>	<b>6</b>
GRP78	78 kDa glucose-regulated protein	72	<b>297</b>	<b>117</b>	<b>7</b>	<b>2</b>
PLEC1	Plectin-1	531	0	234	0	<b>4</b>
PSA5	Proteasome subunit alpha type-5	26	<b>104</b>	<b>229</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
TPIS	Triosephosphate isomerase	27	0	<b>208</b>	0	<b>4</b>
K1C17	Keratin, type I cytoskeletal 17	48	<b>199</b>	<b>54</b>	<b>5</b>	<b>1</b>
ZA2G	Zinc-alpha-2-glycoprotein	34	0	<b>194</b>	0	<b>4</b>
DCD	Dermcidin	11	<b>180</b>	<b>186</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
PNPH	Purine nucleoside phosphorylase	32	<b>182</b>	<b>61</b>	<b>3</b>	<b>1</b>
ACTB	Actin, cytoplasmic 1	42	<b>163</b>	0	<b>5</b>	0
ACTG	Actin, cytoplasmic 2	42	<b>163</b>	0	<b>5</b>	0
S10A7	Protein S100-A7	11	<b>161</b>	0	<b>4</b>	0
K1C14	Keratin, type I cytoskeletal 14	52	<b>161</b>	<b>98</b>	<b>4</b>	<b>2</b>
SPB3	Serpin B3	45	<b>159</b>	0	<b>4</b>	0
PSA7	Proteasome subunit alpha type-7	28	0	<b>152</b>	0	<b>3</b>
S10A8	Protein S100-A8	11	<b>148</b>	0	<b>3</b>	0
CAN1	Calpain-1 catalytic subunit	82	0	<b>138</b>	0	<b>3</b>
A26CB	ANKRD26-like family C member 1B	121	133	0	<b>4</b>	0
PARK7	Protein DJ-1	20	<b>119</b>	<b>89</b>	<b>3</b>	<b>2</b>
MDHM	Malate dehydrogenase, mitochondrial	35	<b>119</b>	<b>94</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
SPB12	Serpin B12	46	<b>101</b>	<b>108</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
GLRX1	Glutaredoxin-1	12	<b>42</b>	<b>106</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
HSPB1	Heat shock protein beta-1	23	<b>100</b>	0	<b>2</b>	0
SPB7	Serpin B7	43	0	<b>98</b>	0	<b>2</b>
GSHB	Glutathione synthetase	52	<b>96</b>	<b>98</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

SODC	Superoxide dismutase [Cu-Zn]	16	<b>82</b>	<b>98</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
S1A7A	Protein S100-A7A	11	97	0	2	0
HSP7C	Heat shock cognate 71 kDa protein	71	<b>97</b>	<i>47</i>	<b>2</b>	<i>1</i>
PPGB	Lysosomal protective protein	54	0	<b>90</b>	0	<b>2</b>
STRC	Stereocilin	193	<b>90</b>	<b>34</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
STRCL	Putative stereocilin-like protein	192	<b>90</b>	<b>34</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
THIO	Thioredoxin	12	0	<b>89</b>	0	<b>2</b>
PSB6	Proteasome subunit beta type-6	25	<b>76</b>	<b>86</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
APRV1	Retroviral-like aspartic protease 1	37	0	<b>83</b>	0	<b>1</b>
PK1L3	Polycystic kidney disease protein 1-like 3	196	<b>82</b>	<b>72</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
A26CA	ANKRD26-like family C member 1A	121	66	0	2	0
HSP72	Heat shock-related 70 kDa protein 2	70	65	<i>45</i>	<b>2</b>	<i>1</i>
PSA7L	Proteasome subunit alpha type-7-like	29	0	62	0	1

### III-B.1.2. Comparaison topologique (PA/SCP)

La **structure et les fonctions** de la peau palmo-plantaire sont assez différentes en comparaison de la peau plus fine des autres parties du corps. Nous avons comparé des échantillons de différentes zones de peau à savoir de la jambe (PA) qui est une zone où la desquamation s'effectue normalement et de la plante de pied (SCP) où au contraire la desquamation est modifiée avec un épaissement de la couche de *stratum corneum*. Cette épaisseur peut être reliée au degré de stress mécanique subi par les zones palmo-plantaires [229].

L'analyse des deux types d'échantillons a mis en évidence des protéines plus ou moins dégradées selon le type de peau étudié. Les protéines identifiées peuvent être classées en **4 groupes selon leur état de dégradation protéolytique** (Figure 53). Des protéines peu dégradées avec l'identification de 1 ou 2 peptides différents, des protéines dégradées de manière plus importante au niveau du *stratum* plantaire comme certaines kératines, des protéines au contraire plus dégradées dans les zones de peau non palmo-plantaire et enfin des protéines qui présentent le même profil de dégradation quelle que soit la zone.

Parmi ces protéines, se trouvent notamment les protéines du **cornéodesmosome**, ce qui semble montrer que le phénomène de desquamation a un effet qualitativement identique sur ces protéines. En revanche, l'accumulation de peptides endogènes issus de la dégradation des kératines dans les zones plantaires pourrait indiquer une dégradation exacerbée de ces protéines, ce qui protégerait d'un point de vue quantitatif la dégradation des protéines cornéodesmosomales et retarderait la desquamation des couches supérieures de *stratum*. Au contraire, si on associe l'épaississement de la peau à un stress mécanique plus important, le processus de desquamation étant ralenti, toutes les protéines sont plus longtemps en contact avec les protéases de la peau ; les kératines, quoique plus résistantes, finissent par

être dégradées elles aussi avec une accumulation de peptides endogènes qu'il nous ait alors possible d'analyser.

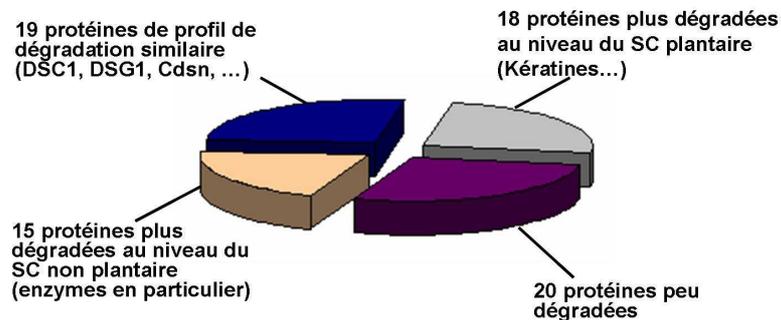


Figure 53 : Comparaison topologique des protéines identifiées dans le *stratum corneum* plantaire ou non.

Pour les protéines communes aux deux types d'échantillons, nous avons représenté le rapport du nombre de spectres MS/MS de ces deux types d'échantillons PA/SCP. Si un peptide est fragmenté plusieurs fois, toutes ses contributions ont été comptabilisées. En effet, il se pourrait que les **produits de dégradation** d'une protéine soient les mêmes dans les deux échantillons mais que leurs **quantités** soient différentes. Ceci s'apparente aux méthodes de quantification sans marquage isotopique par *spectral counting* [230] : le compte du nombre de spectres permet d'estimer les changements relatifs d'abondance de chaque protéine. Cela présuppose que la couverture d'une protéine augmente avec son abondance. Une augmentation du nombre de MS/MS traduit donc que la protéine est plus présente dans l'échantillon. Dans notre cas, cela traduit que la protéine en question est **soit plus présente soit plus dégradée** puisque nous ne nous intéressons qu'aux peptides endogènes, produits de la protéolyse des protéines étudiées. En ce qui concerne les protéines identifiées dans un seul des groupes d'échantillons, nous avons considéré un nombre minimum de peptides fictifs de 3 pour l'échantillon où la protéine n'a pas été identifiée. En effet, l'un des critères de validation que nous avons choisis est l'identification d'au moins un peptide de la protéine en triplicat.

Parmi les protéines communes aux deux types d'échantillons (Figure 54A) mais identifiées de façon différentielle, on peut noter par exemple le cas de deux kératines dont 7 à 10 fois plus de peptides endogènes sont identifiés dans les échantillons de *stratum corneum* non plantaire. Il s'agit des **kératines K1C10 et K22E**. Or cette paire devient majoritaire dans les couches les plus externes et les plus différenciées de l'épiderme [134]. *A contrario*, 30 fois plus de peptides de la **K1C9** sont identifiés dans le *stratum corneum* plantaire ; or l'expression de cette protéine est confinée dans l'épiderme palmo-plantaire [136]. Il est donc possible que la surabondance de peptides endogènes de ces deux protéines ne soit liée qu'à la **surexpression des protéines** elle-même et non à leur dégradation exacerbée.

Lors de cette comparaison topologique, nous avons identifié près de 5 fois plus de peptides endogènes pour la **filaggrine** dans les échantillons de *stratum* non plantaire que plantaire. De plus, des peptides de filaggrine 2 n'ont été identifiés que dans les échantillons non plantaires. Or, la filaggrine est aussi exprimée au niveau du *stratum corneum* plantaire [231]. L'identification d'un plus grand nombre de peptides endogènes dans la zone non plantaire pourrait donc être directement liée à une **dégradation plus importante** au niveau de cette zone. Cette protéine est synthétisée sous forme de pro-protéine et progressivement protéolysée : d'abord dégradée en monomère de filaggrine puis complètement en acides aminés dans les couches les plus superficielles du *stratum corneum* ce qui permet de maintenir l'hydratation de l'épiderme [130]. Cette variation, en termes de dégradation, que nous avons observée au niveau des peptides endogènes, peut donc être reliée à l'hydratation amoindrie des zones de peau palmo-plantaires. De plus, il a récemment été montré que l'**hydrolase bleomycine** et dans une moindre mesure la **calpaïne-1** jouaient un rôle important dans cette dégradation [232]. Or, nous avons identifié plus de peptides de ces deux protéases dans les échantillons de *stratum corneum* non plantaire : ceci pourrait traduire uniquement une surexpression (et non une surdégradation) de ces protéases et donc expliquer la dégradation des filaggrines dans ces échantillons.

Dans les échantillons de *stratum corneum* plantaire, se trouve la **dermokine** dont la dégradation est au moins cinq fois plus importante dans ce tissu que dans le *stratum corneum* non plantaire. Cette protéine est une protéine sécrétée dont la fonction n'est pas encore clairement définie. Il a déjà été décrit une transcription abondante au niveau de l'épiderme mais sans qu'une étude topologique n'ait été réalisée [233].

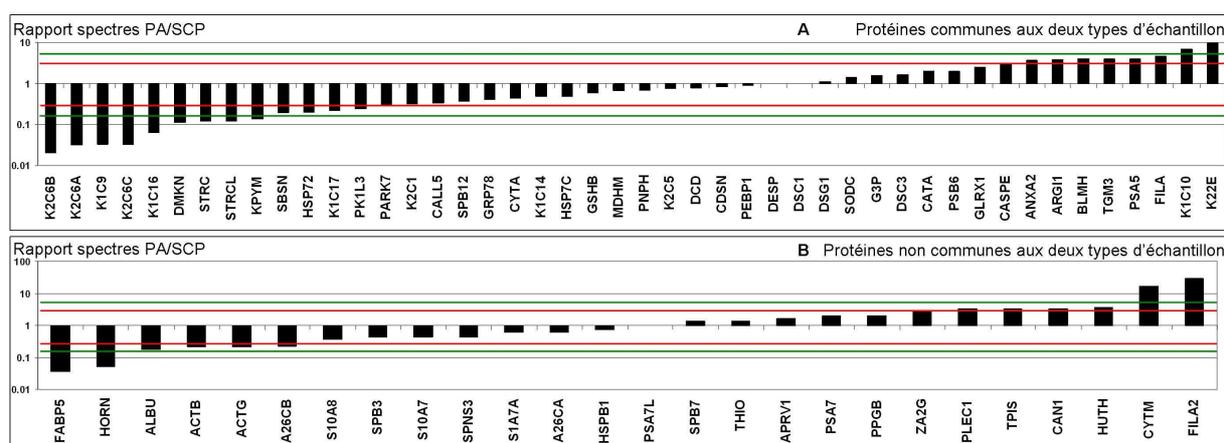


Figure 54 : Comparaison des protéines identifiées selon le type de peau étudié.

Rapport du nombre de peptides identifiés dans les échantillons de SC non plantaire sur le nombre de peptides identifiés dans les échantillons de SC plantaire. A : Protéines identifiées dans les deux échantillons. B : Protéines identifiées dans un seul des deux types d'échantillon. En vert, rapport 5 ou 1/5. En rouge 3 ou 1/3.

### **III-B.1.3. Les protéines des cornéodesmosomes**

Ce type d'approche peptidomique nous a permis d'obtenir des informations sur le **profil de dégradation des protéines cornéodesmosomales**. En effet 26% des peptides identifiés correspondent de manière inattendue à des protéines impliquées dans les propriétés adhésives des cornéodesmosomes comme les **cadhérines, la cornéodesmosine, la desmoplakine ou la pkakoglobine**. Ceci est assez remarquable car lors de nos analyses classiques protéomiques sur des échantillons de *stratum corneum* plantaire digéré, assez peu de peptides de ces protéines ont été identifiés. Ainsi par exemple, en analyse protéomique LC1D, nous n'avons identifié que **9 peptides tryptiques** de desmocolline 1 alors que nous avons pu identifier **41 peptides endogènes**. Cette différence peut donc mettre en évidence une dégradation exacerbée de ces protéines par rapport à d'autres familles de protéines. Il faut tout de même noter que les échantillons ne sont pas préparés de manière identique. En effet, dans le cas des échantillons de peptides endogènes, les échantillons de peau subissent une première étape d'extraction dans un tampon durant une nuit. En revanche, pour les échantillons digérés, aucune étape d'extraction n'a été utilisée : la peau est directement digérée en la considérant comme un morceau de gel. Ainsi, il est possible que l'étape d'extraction permette d'accumuler plus de peptides endogènes de toutes les familles de protéines dégradées alors que la digestion directe ne conduit qu'à l'obtention de peptides protéolytiques à partir des protéines les plus accessibles en surface.

#### **a Les cadhérines**

Nous avons découvert **141 peptides uniques** provenant de 3 protéines de la famille des cadhérines : **la desmocolline 1 (DSC1), la desmocolline 3 (DSC3) et la desmogléine 1 (DSG1)**. Dans l'épiderme, les isoformes des cadhérines sont exprimées de manière différente : les formes 2 et 3 sont exprimées dans les couches profonde

s alors que les formes 1 le sont dans les couches supérieures [158-160]. Il n'est donc pas surprenant d'identifier principalement des peptides endogènes des formes 1. L'observation de peptides de DSC3 est plus singulière même si ces peptides peuvent correspondre à une dégradation de la protéine dans les couches plus profondes mais avec subsistance et accumulation jusqu'aux couches supérieures auxquelles nous avons accès. Il faut noter qu'environ deux fois plus de peptides de DSC3 (uniques ou redondants) ont été identifiés dans les échantillons de *stratum corneum* non plantaire, ce qui impliquerait donc une accumulation plus importante depuis les couches profondes au niveau d'un épiderme où la desquamation a lieu normalement. (Tableau 10 et Figure 54). Cette disproportion mise en parallèle d'une identification semblable au niveau des formes DSC1 et DSG1 pourrait mettre en évidence un rôle plus important de la DSC3 au niveau de la desquamation.

Sur les figures suivantes (Figure 55), nous avons représenté en couleurs les peptides identifiés en fonction du domaine auquel ils appartiennent. Pour chaque protéine de cette famille, nous avons observé des peptides endogènes dans chacun de ses « **domaines cadhérines** » et aucun dans le domaine transmembranaire ni dans le domaine intracellulaire. Or ces protéines sont impliquées dans **l'adhésion entre desmosomes** [145] et les deux types de protéines (desmocolline et desmoglérine) sont nécessaires dans des interactions hétérotypiques [161, 234]. Ces cadhérines sont également engagées dans des interactions homotypiques au niveau des jonctions d'adhérence [235]. L'observation de peptides endogènes uniquement dans les domaines cadhérines semble donc indiquer une **dégradation préférentielle** de ces domaines, ce qui vient bien confirmer le rôle prépondérant de ces domaines dans l'adhésion entre cellules.

Cependant, chaque domaine ne semble pas dégradé de la même manière. Par exemple, pour la desmocolline 1, nous avons identifié 27 peptides différents provenant du premier domaine cadhérine alors que nous n'avons identifié qu'entre 5 à 12 peptides des autres domaines. Le premier domaine semble donc être la cible préférentielle de dégradation. Ceci est intéressant : en effet, les liaisons adhésives des cadhérines impliquent la formation de dimères de feuillettes entre les domaines 1 des cadhérines des cellules opposées [236]. Une dégradation visant préférentiellement le premier domaine pourrait donc être liée à un rôle plus important de ce domaine dans l'adhésion entre cadhérines.

Cependant, d'un point de vue quantitatif, si on compte combien de fois chaque peptide a été identifié dans les différentes analyses, en moyenne les peptides du dernier domaine cadhérine sont plus souvent identifiés. Cela impliquerait que le premier domaine est dégradé en de plus nombreux sites mais de manière moins préférentielle. Cependant cette différence peut être simplement due à une meilleure ionisation de certains peptides endogènes du 5<sup>ème</sup> domaine comparativement aux peptides du 1<sup>er</sup> domaine. Il est difficile de tirer une conclusion sur ces données dans la mesure où l'efficacité d'ionisation en électrospray dépend de différents paramètres physico-chimiques, qui peuvent favoriser l'identification de certains peptides par rapport à d'autres en fonction de leur séquence en acides aminés.

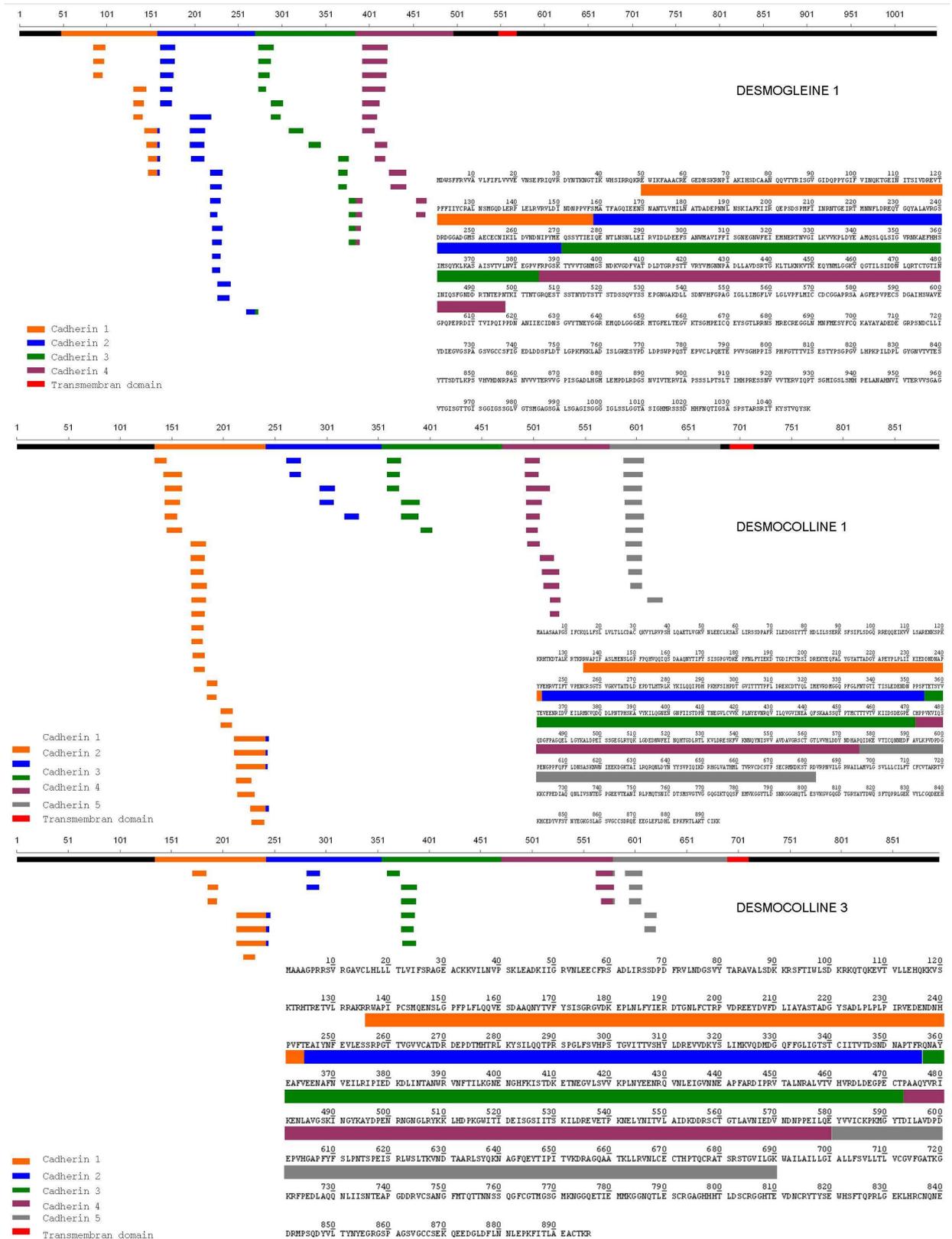


Figure 55 : Profil de dégradation des cadhérines identifiées. Les peptides identifiés dans les échantillons de *stratum corneum* plantaire et non plantaire ont été regroupés.

### ***b La cornéodesmosine***

Parmi les autres protéines des cornéodesmosomes identifiées, de nombreux peptides de la cornéodesmosine ont été caractérisés. Ceci est également surprenant car cette protéine est très peu représentée dans les échantillons de *stratum corneum* plantaire digéré où seuls **3 peptides tryptiques** ont été séquencés en LC1D. En revanche, lors de nos analyses de peptides endogènes de *stratum corneum*, **43 peptides endogènes** ont été identifiés.

Les peptides que nous avons caractérisés ne couvrent pas l'intégralité de la séquence de la protéine. Comme le montre la Figure 56, des peptides ont été caractérisés dans la **boucle glycine N-terminale** ainsi que dans une **zone centrale de la protéine riche en sérines**. Aucun peptide de la boucle glycine C-terminale n'a été observé. Or il a été montré que cette protéine agit comme une molécule d'adhésion et que sa dégradation est un prérequis au phénomène de desquamation [146]. Ainsi les données de Jonca *et al.* ont permis de confirmer les propriétés d'interactions homotypiques de la cornéodesmosine. La boucle glycine N-terminale est suffisante mais non nécessaire pour la mise en place de ces interactions [163]. Notamment, il a été montré par Simon *et al.* que la protéine est d'abord dégradée au niveau des extrémités C- et N-terminales, puis elle perd la boucle glycine N-terminale et enfin une partie de la boucle glycine C-terminale ainsi qu'une zone centrale de la protéine. Après ces étapes de dégradation, ne subsiste dans les couches superficielles qu'une seule partie centrale de la protéine (entre les acides aminés 300 et 425 selon les auteurs) qui ne présente plus de caractère adhésif [165]. Nos observations de peptides uniquement entre les acides aminés 69 et 367 sont bien en accord avec ces données. Tant en termes qualitatifs que quantitatifs, un plus grand nombre de peptides ont été identifiés dans la zone centrale de la cornéodesmosine que dans la boucle N-terminale. Même si la boucle glycine semble plus importante pour conférer à la protéine ses qualités adhésives, nos résultats ne sont pas contradictoires : en effet, si la dégradation de la boucle glycine a eu lieu plus profondément que la dégradation de la zone centrale, il peut être normal d'avoir « perdu » les peptides endogènes qui nous permettraient de tracer cette première dégradation. Finalement, il faut tout de même noter que nous avons identifié 20 peptides différents entre les acides aminés 297 et 367 alors que cette zone est censée encore appartenir à la dernière forme observée par Simon *et al.* Il pourrait donc être envisagé l'existence d'une **forme plus légère** que 15kDa (environ 5kDa entre 368-423) : forme si légère qu'elle sortirait des gels dans les conditions où ils ont été réalisés dans les travaux de Simon *et al.*

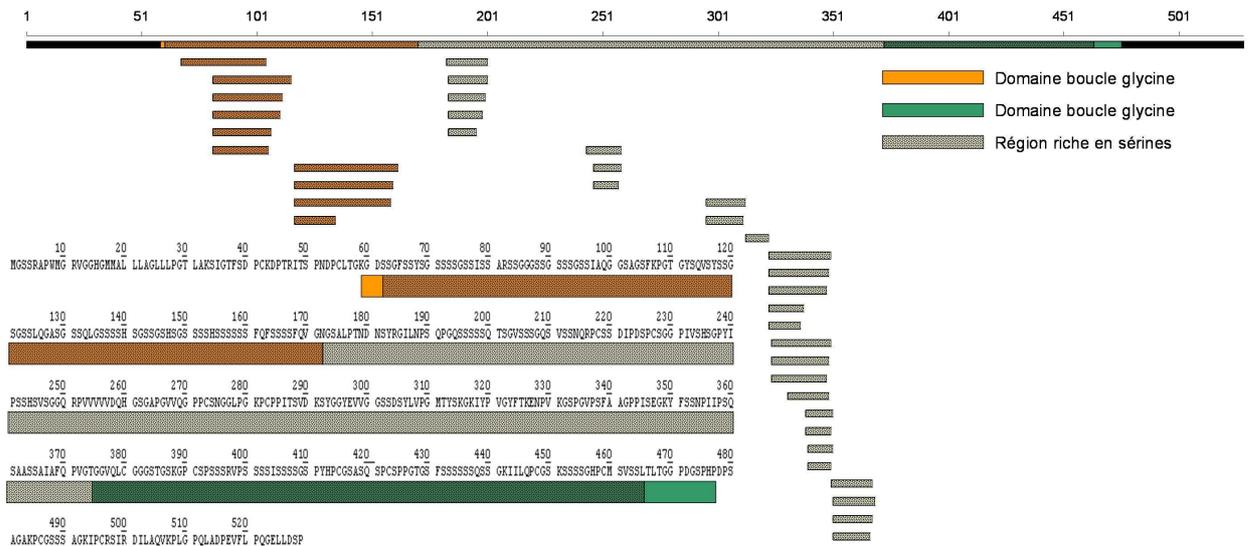


Figure 56 : Profil de dégradation de la cornéodesmosine. Les peptides identifiés dans les échantillons de SC plantaire et non plantaire ont été regroupés.

### c Les protéines de la plaque et les protéines armadillo

Parmi les autres protéines des cornéodesmosomes assurant une fonction importante d'adhésion, nous avons identifié une soixantaine de peptides différents de la **desmoplakine**. Les peptides endogènes caractérisés font partie d'un domaine particulier de la protéine situé dans sa zone C-terminale, noté **DPCT**, et qui interagit avec les **filaments intermédiaires (FI)** [137]. Ce domaine présente trois sous-domaines homologues A, B et C qui contiennent chacun 4,5 copies d'un motif plakin [151] (Figure 57). Au cours de nos analyses, nous avons identifié 2 peptides dans la zone C-terminale du domaine C et tous les autres sur l'intégralité du domaine B. Or, Choi *et al.* ont montré que tous les sous-domaines pris individuellement sont capables de lier la **vimentine** (membre de la famille des filaments intermédiaires) mais que le motif B-C présente une liaison plus forte que chaque motif B et C pris séparément [150]. Une dégradation préférentielle du domaine B pourrait indiquer qu'il suffit de protéolyser ce domaine pour **casser l'interaction desmoplakine-FI**.

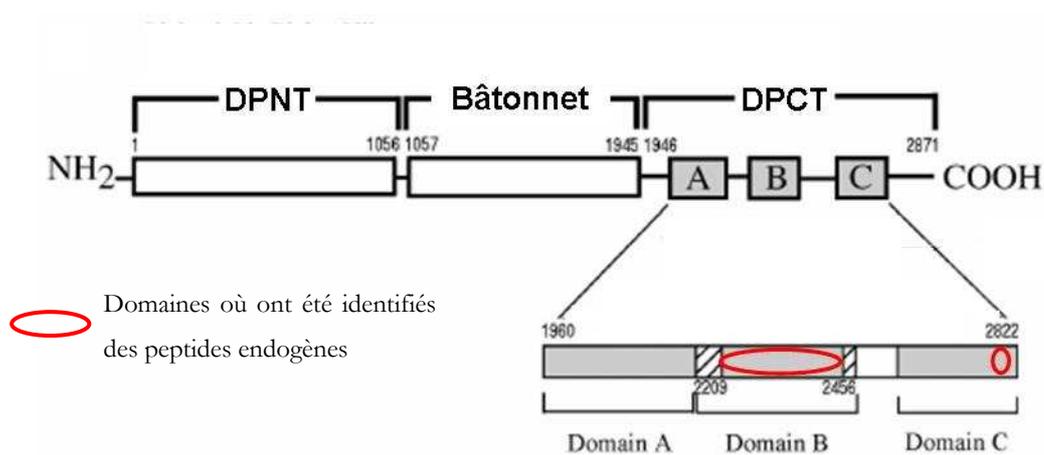


Figure 57 : Structure primaire de la desmoplakine (d'après [150]) montrant les différents domaines et sous-domaines de la protéine ainsi que les zones où nous avons identifié des peptides endogènes. Les acides aminés de début et fin de domaine sont indiqués. DPNT : domaine N-terminal de la desmoplakine ; DPCT : domaine C-terminal de la desmoplakine.

De manière surprenante, nous n'avons identifié quasiment **aucun peptide des protéines armadillo** (comme la plakoglobine ou les plakophilines) alors que ces protéines interviennent également dans l'édifice global des interactions des protéines des cornéodesmosomes [237] et ont, de surcroît, des profils d'expression dans l'épiderme semblable aux cadhérines 1 ou à la desmoplakine [149, 237]. En effet, les cadhérines interagissent avec la plakoglobine au niveau de leur domaine intracellulaire [238], domaine dans lequel nous n'avons identifié aucun peptide non plus. La plakoglobine interagit également avec le domaine N-terminal de la desmoplakine [239] où de la même manière, nous n'avons identifié aucun peptide. Les plakophilines, au même titre que la plakoglobine, semblent jouer un rôle de jonction en interagissant à la fois avec les cadhérines, la desmoplakine et la plakoglobine [154].

Dans leur ensemble, nos résultats en termes de peptides endogènes des cornéodesmosomes montrent que la **desmoplakine et les cadhérines sont les protéines les plus dégradées**. Cela pourrait indiquer que les interactions intracellulaires desmoplakine-FI jouent un rôle tout aussi important que les interactions extracellulaires cadhérine-cadhérine dans le complexe cornéodesmosome-FI. Ainsi **la desquamation qui passe par la dégradation des cornéodesmosomes pourrait ne pas faire intervenir que la protéolyse des cadhérines seules mais également celle de la desmoplakine**.

#### III-B.1.4. Les peptides antimicrobiens

L'étude des peptides endogènes de la peau nous a également permis d'obtenir des informations sur les peptides antimicrobiens présents au niveau de ce tissu.

L'épiderme humain forme un **bouclier protecteur** consistant en une barrière mécanique dense composée de l'enveloppe cornée et de couches de lipides et de kératines pour empêcher l'invasion des microbes. Cependant, les cellules de l'épiderme ne sont pas seulement une barrière mécanique passive mais elles peuvent aussi sécréter des molécules pour combattre les agents pathogènes externes. Cette défense initiale est définie comme la réponse immunitaire innée et présente **3 fonctions majeures** : 1) reconnaissance des agents pathogènes, 2) induction de molécules pour activer les cellules dont le but est d'éliminer ces agents et 3) sécrétion de molécules pour combattre directement ces agents. Ces deux dernières fonctions sont notamment assurées par des molécules appelées peptides antimicrobiens (AMPs) [240]. La séquence de ces peptides est variable mais de nombreux AMPs présentent une activité antimicrobienne contre un large spectre de bactéries, de champignons et de virus. La peau est une source importante d'AMPs. Parmi eux, nous avons identifié, dans nos analyses, la dermcidine ainsi que des protéines de la famille S100.

#### **a La dermcidine**

La **dermcidine (DCD)** est une protéine de 110 acides aminés, identifiée dans les glandes sudoripares de type eccrine [220]. La DCD est sécrétée dans la sueur et n'est pas inductible par une blessure ou une inflammation de la peau [219]. Dans la sueur, le processus protéolytique génère un peptide de 47 acides aminés (**dermcidin-1, DCD-1**) qui présente une large **activité antimicrobienne** [220] mais avec un mécanisme restant à élucider. Cette protéine est sécrétée en tant que proprotéine puis processée dans la partie C-terminale de la proprotéine : les peptides de DCD sont alors distribués à la surface de la peau par la sueur [241]. Il a été montré par digestion *in vitro* que la cathepsine D était capable de générer certains fragments observés : nombre d'entre eux sont stables et quelques-uns présentent une plus forte activité antimicrobienne que le peptide DCD-1 [241, 242]. En 2002 puis en 2006, Flad puis Rieg ont identifié différents peptides dérivés de DCD-1 par SELDI-TOF et séquençage d'Edman [242, 243]. Rieg *et al.* ont également montré des différences topologiques dans la concentration de la sueur en peptides dérivés de la DCD avec des **quantités plus grandes dans la sueur des paumes, des bras et du front**. Cela souligne que la sécrétion de DCD est plus prononcée dans des zones du corps plus souvent exposées à des agents pathogènes ou à des traumatismes mineurs [242]. Au cours de nos analyses, nous n'avons identifié des peptides que dans la partie DCD-1 de la protéine et notamment le peptide LEK-26 (<sup>66</sup>LEKGLDGAKKAVGGLGKLGKDAVEDL<sup>91</sup>) déjà décrit. Nous avons notamment identifié deux peptides mettant en évidence le clivage entre la Leu91 et le Glu92, clivage par la cathepsine D décrit *in vitro* [241]. D'autre part, nous n'avons pas noté de différences majeures entre les zones étudiées puisque nous avons identifié 7 spectres MS/MS correspondants à des peptides de DCD dans le *stratum corneum* non plantaire contre 9 dans le *stratum corneum* plantaire même si un seul peptide a été identifié en commun dans les deux échantillons (Figure 58). Aucun de nos peptides

ne possède les résidus SSL (en N-terminal du peptide DCD-1). Or il a été montré que ces résidus semblaient importants pour assurer la fonction antimicrobienne [244]. Il pourrait donc être intéressant de tester l'activité antimicrobienne des nouveaux peptides que nous avons découverts pour confirmer ou infirmer ces observations.

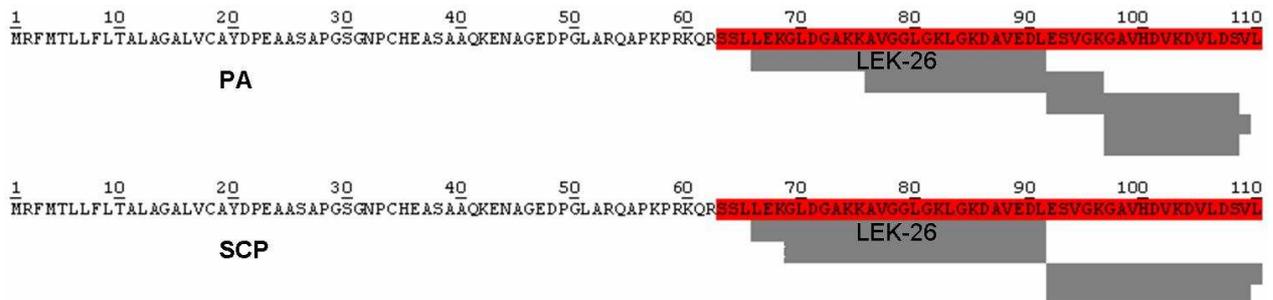


Figure 58 : Peptides dérivés de la DCD identifiés dans les échantillons de *stratum corneum* non plantaire (PA) et plantaire (SCP). En rouge est rappelé le peptide DCD-1.

### ***b Les protéines de la famille S100***

Les **protéines S100** forment une famille de protéines de bas poids moléculaire qui lient le calcium et qui partagent des motifs structuraux communs. Parmi eux, se trouvent notamment **2 domaines hélice-boucle-hélice de liaison du calcium**, plusieurs domaines type hélice  $\alpha$  et un domaine central flexible. La psoriasine (S100A7), membre de la famille des protéines S100 qui lient le calcium, est synthétisée abondamment par les patients souffrant de psoriasis [245]. Gläser *et al.* ont montré que la psoriasine possédait une **activité antibactérienne** et protégeait la peau humaine contre les infections par *E. coli* [246] en envisageant que sa capacité à séquestrer le zinc était impliquée dans ce phénomène. Cette protéine est présente en fortes concentrations au niveau du visage, du cuir chevelu, des paumes et des plantes des pieds [246]. De plus, elle est produite de manière constitutive par les **kératinocytes**. Des expériences de mutagenèse ont permis de montrer que l'inactivation du motif liant le zinc réduisait sa fonction antibactérienne mais que le motif N-terminal de liaison du calcium n'était pas nécessaire à cette activité [247]. En particulier la région centrale de la psoriasine incluant les acides aminés 35-80 semble suffire à la pleine activité antibactérienne de la protéine.

Au cours de nos analyses, nous avons identifié des peptides issus de la protéine S100A7 et S100A8 **uniquement dans les échantillons de *stratum corneum* plantaire**. Ces peptides sont distribués sur toute la séquence des protéines (Figure 59). Cependant, il faut noter que le peptide le plus souvent identifié pour la S100A7 est le peptide N-terminal acétylé alors que pour la S100A8, il s'agit d'un peptide central situé au niveau du motif C-terminal de liaison du calcium. L'observation des séquences

LADVFEKKDKNEDKKIDFSEF et LSLLGDIATDYHKQSHGAAPCSGGSQ qui se suivent dans la séquence protéique permet de mettre en évidence un clivage (F/L) qui pourrait être dû à la **cathepsine D**. Nous avons notamment découvert 2 peptides situés dans la zone potentiellement responsable de l'activité antimicrobienne : un test d'activité de ces peptides pourrait être intéressant pour confirmer cette hypothèse. Nos identifications viennent en tout cas confirmer l'observation en ESI-MS par Schröder de formes tronquées de la protéine S100A7A [248].

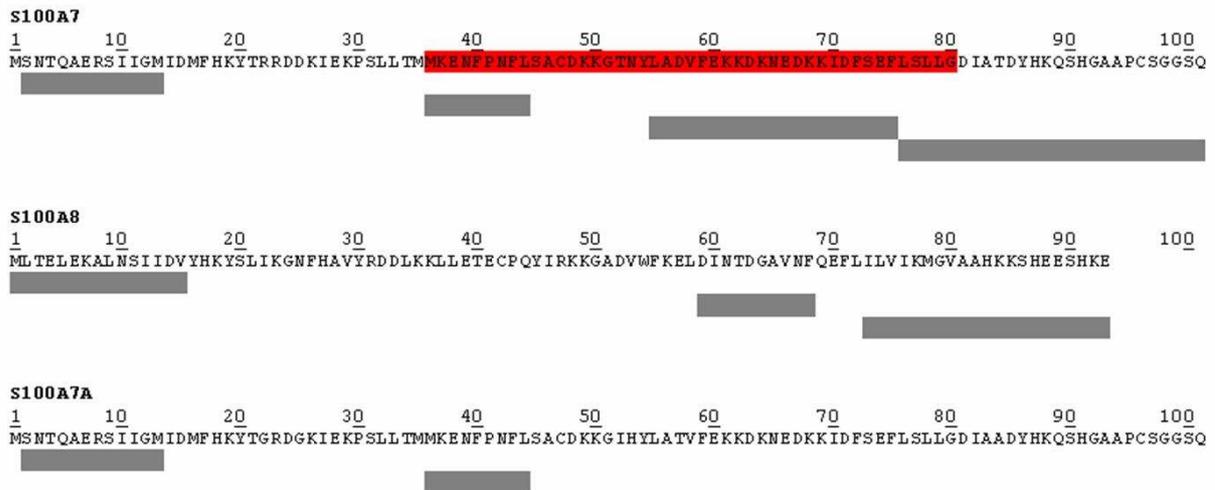


Figure 59 : Peptides dérivés des protéines de la famille S100, identifiés dans les échantillons de *stratum corneum*. En rouge est rappelée la zone centrale nécessaire à l'activité antibactérienne de la S100A7.

### **III-B.2. A la recherche des protéases impliquées : données issues de la LC-MS/MS**

*Protocoles de référence :*

Préparation des échantillons non digérés : **V-A.1.2.** p.145, **V-A.1.3.** p.145, **V-A.1.4.** p.146

Expérience LC-MS/MS : **V-A.3.1. b** p.148, **V-A.5.2.** p.153

Recherche dans les banques et validation : **V-A.6.1. a** p.154, **V-A.6.2. b** p.155

#### **III-B.2.1. Tendances générales**

A partir des peptides identifiés en LC-MS/MS, il est possible de mettre en évidence quelles sont les **activités protéolytiques** les plus représentées dans nos échantillons. Pour cela, nous avons observé les extrémités N- et C-terminales des peptides endogènes identifiés ainsi que les acides aminés des protéines dont ils sont issus qui sont situés avant et après ces peptides.

Pour identifier les protéases susceptibles d'être impliquées, il est possible de travailler par des approches avec et sans *a priori*. En effet, d'après les données de la littérature, il est déjà connu que la **SCCE** (*stratum corneum chymotryptic enzyme*), le **SCTE** (*stratum corneum tryptic enzyme*) et la **cathepsine D** sont des protéases fortement engagées dans la dégradation des protéines des cornéodesmosomes. Connaissant les sites de coupure de ces protéases (Tableau 11), la proportion de sites de coupure observés en LC-MS/MS pouvant leur correspondre peut être déduite.

**Tableau 11 : Sites de coupure des protéases décrites dans la dégradation des cornéodesmosomes.**

Protéases	Sites de coupures
SCTE	K/ ; R/
SCCE	F/ ; L/ ; Y/ ; W/
Cathepsine D	F/ ; L/ ; /V ; /L ; /F ; /Y

Mais pour les sites de coupure différents de ces protéases, il est également possible de faire des recherches dans les banques de données notamment sur le site MEROPS (<http://merops.sanger.ac.uk/index.htm>). Cette base de données est une ressource d'informations en ce qui concerne les protéases mais également leurs inhibiteurs. Un outil de recherche permet notamment de rechercher à partir des acides aminés situés avant et après un site de coupure observé (P4P3P2P1/P1'P2'P3'P4'), quelles sont les protéases capables de casser une telle liaison.

Nous avons donc quantifié les différentes activités en comptant les sites de coupure observés correspondant à chaque activité. Nous avons compté **toutes les occurrences** de ces sites que ce soit dans le même peptide, mais observé de façon redondante, ou dans des peptides différents. Que ce soit pour les échantillons de *stratum corneum* plantaire ou non plantaire, l'activité principalement observée est une activité **chymotryptique** (Figure 60), ce qui correspond aux données bibliographiques. En effet, la **SCCE** est une protéase impliquée dans la desquamation et capable de dégrader la cornéodesmosine et la desmocolline 1 directement *in vitro* [184]. La seconde activité qui ressort est l'activité **tryptique** également décrite dans la littérature comme impliquée dans la dégradation des protéines cornéodesmosomales. En effet, le **SCTE** permet notamment d'**activer la SCCE** afin que celle-ci puisse dégrader la desmogléine 1 [184] et permet également de dégrader la cornéodesmosine [165]. Enfin, dans une moindre mesure, des sites pouvant correspondre à une activité de type **cathepsine D**, protéase impliquée dans **l'étape finale de la desquamation** [178], sont observés.

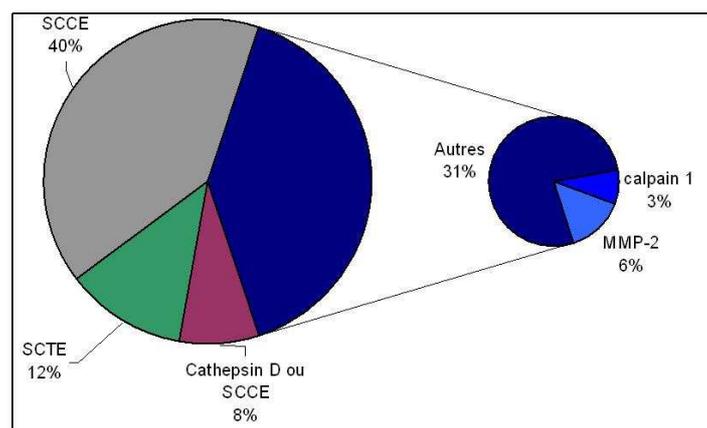


Figure 60 : Activités protéolytiques principalement observées d'après les données LC-MS/MS.

Cependant, une très grande partie des sites de coupure observés (40%) ne correspond à **aucune des trois activités** préalablement citées. Grâce aux recherches dans la banque de données MEROPS, nous avons pu retrouver que certains sites P1/P1' (représentant au moins 1% des sites observés) pouvaient correspondre à des activités type **calpaïne-1** (localisée dans le cytoplasme des kératinocytes de couches supérieures de l'épiderme et capable de dégrader notamment la filaggrine *in vitro* [232]) ou type gélatinase A (MMP-2, exprimée par les fibroblastes dermiques [249]).

### III-B.2.2. Cas particulier : la cornéodesmosine

Dans le cas de la cornéodesmosine et pour les peptides identifiés avec un score supérieur à 30, le nombre de sites de coupure **chymotryptiques** est comparable aux résultats globaux sur toutes les protéines (38% pour la cornéodesmosine contre 40% en moyenne sur l'ensemble des protéines sont des sites chymotryptiques). En revanche, les sites **tryptiques** représentent environ 25% des sites identifiés sur la cornéodesmosine, soit plus de deux fois plus que pour les échantillons globalement. Cette protéine semble donc être une **cible privilégiée de la SCTE** par rapport à la moyenne. En ce qui concerne les autres sites, il faut constater une nette diminution de la proportion des sites type cathepsine D (de 8 à 1%) au profit principalement de l'activité SCTE déjà mentionnée et surtout d'une activité type **cathepsine L** (moins de 1% pour l'ensemble des protéines et 14% pour la cornéodesmosine). Ceci est extrêmement intéressant dans la mesure où Bernard *et al.* ont déjà mis en évidence une protéase nommée **stratum corneum cathepsin-L-like (SCCL)** capable de dégrader la cornéodesmosine *in vitro* [175]. Nos données qui proviennent de l'*in vivo* viennent ici confirmer ces informations. Le reste des sites observés pour la cornéodesmosine (soit encore 15%) ne peut être attribué à aucune protéase de la peau (Figure 61).

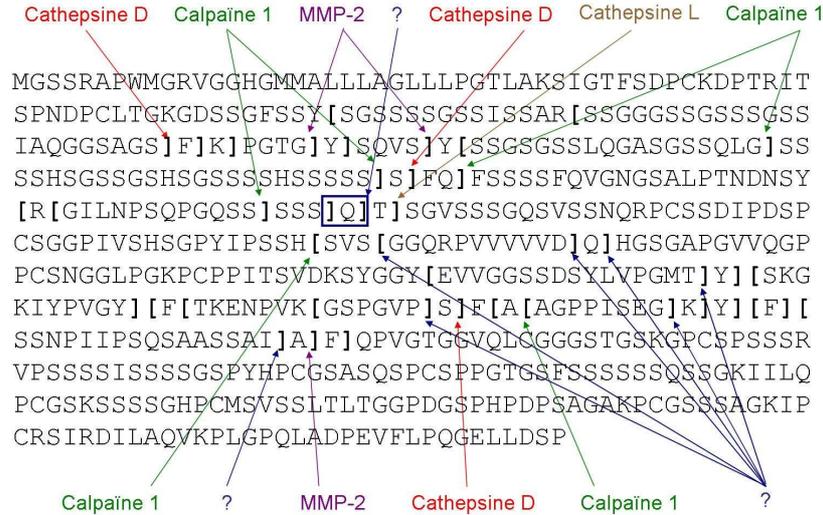


Figure 61 : Sites de coupure autres que SCCE et SCTE identifiés sur la cornéodesmosine.

### III-B.3. A la recherche des protéases impliquées : analyses de peptides fluorescents de la cornéodesmosine

Afin de cibler les protéases impliquées grâce à une approche indépendante, nous avons fait synthétiser des **peptides fluorescents**. Il s'agit d'octopeptides synthétisés suivant la séquence de la cornéodesmosine et en regard des sites de clivages observés ou non en LC-MS/MS. Neuf peptides ont été synthétisés spécifiquement autour de sites observés et 4 autres dans des zones où aucun site n'avait été identifié. La séquence de la cornéodesmosine, les sites identifiés ainsi que les peptides synthétisés sont présentés sur la Figure 62.

MGSSRAPWMGRVGGHGMALLLAGLLLPGLAKSIGTFSDPCKDPTRIT  
 SPNDPCLTGKGDSSGFSSY[SGSSSS**GSSISSAR**[SSGGGSSGSSSSGSS  
 IAQGG SAGS]F]K]PGTG]Y]SQVS]Y[**SSGSGSSLQGAS**GSSQLG]SS  
 SSHSGSSGSHSGSSSSSHSS**SSS]S]FQ]FSSSSFQVGN**GSALPTNDNSY  
 [R[GILNPSQPGQSS]SSS]Q]T]SGVSSSGQSVSSNQRPCSSDIPDSP  
 CSGGPIVSHSGPYIPSSH[SVS[GGQRPVVVVVD]Q]HGSGAPGVVQGP  
 PCSNGGLPGKPCP**PITSVDKSYGGY**[EVVGGSSDSYLV**PGMT]Y**][SKG  
 KIYPVGY][F[TKENPVK[GSPGVP]S]F[A[AGPPI**SEG]K]Y**][F][  
 SSNPIIPSQSAASSAI]A]F]QPVGTGGVQLCGGGSTGSKGPCSPSSSR  
 VPSSSSISSSSGSPYHPCGSASQSPCPPGTGSFSSSSSSQSSGKIILQ  
 PCGSKSSSSGHPCMSVSSLTLTGGPDGSPHPDPSAGAKPCGSSSAGKIP  
 CRSIRDILAQVKPLGPQLADPEVFLPQGE LLDSP

Figure 62 : Séquence de la cornéodesmosine ; les crochets correspondent aux sites de clivage identifiés en LC-MS/MS.

En rouge sont représentés les peptides synthétisés aspécifiquement et en vert ceux synthétisés spécifiquement.

Ces peptides sont modifiés en N-terminal par un groupe **chromophore Dabcyl** et en C-terminal par un groupe fluorophore **Edans**. Le spectre d'absorption de celui-ci est centré sur 336nm et son spectre d'émission sur 490nm comme le spectre d'absorption du groupe Dabcyl. Ainsi, lorsque les deux groupes sont proches aucune fluorescence n'est mesurable alors que lorsqu'ils sont séparés cela devient possible. Cette propriété permet de suivre le clivage des peptides synthétisés lors des tests enzymatiques.

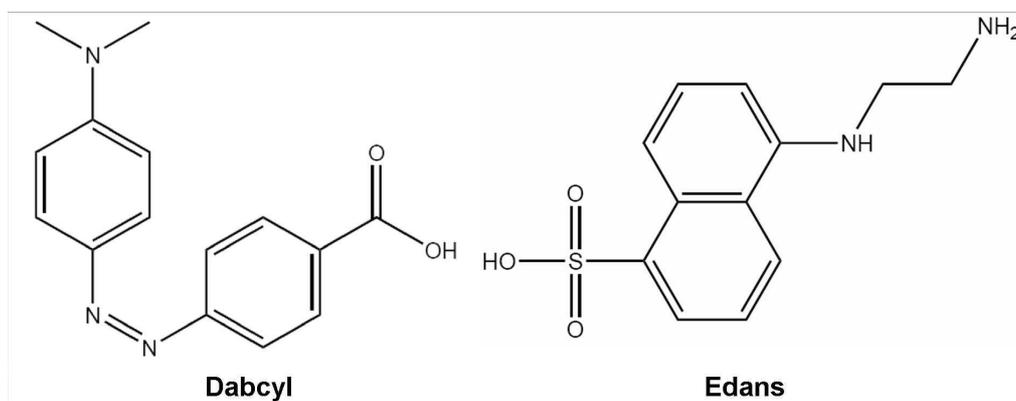


Figure 63 : Formule des groupes Dabcyl et Edans.

Les séquences des peptides, leurs masses et la nomenclature utilisées par la suite sont rappelées dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Caractéristiques des peptides Dabcyl-Edans synthétisés.

Sigle	Séquence	Masse Théorique (MH <sup>+</sup> )
S1 ou CDSN1	Dabcyl-QVSYSSGS-Glu(Edans)	1442,5Da
S2 ou CDSN2	Dabcyl-SSSSFQFS-Glu(Edans)	1504,8Da
S3 ou CDSN3	Dabcyl-NSYRGILN-Glu(Edans)	1564,7Da
S4 ou CDSN4	Dabcyl-SSQTSGVS-Glu(Edans)	1379,8Da
S5 ou CDSN5	Dabcyl-YGGYEVVG-Glu(Edans)	1473,1Da
S6 ou CDSN6	Dabcyl-PGMTYSKG-Glu(Edans)	1468,5Da
S7 ou CDSN7	Dabcyl-PVGFTKE-Glu(Edans)	1568,7Da
S8 ou CDSN8	Dabcyl-GVPSFAAG-Glu(Edans)	1334,9Da
S9 ou CDSN9	Dabcyl-SEGKYFSS-Glu(Edans)	1532,7Da
NS1	Dabcyl-GSSLQGAS-Glu(Edans)	1334,6Da
NS2	Dabcyl-SSSFQVGN-Glu(Edans)	1452,8Da
NS3	Dabcyl-GSSISSAR-Glu(Edans)	1392,6Da
NS4	Dabcyl-PITSVDKS-Glu(Edans)	1473,8Da

### **III-B.3.1. Activité d'un extrait brut de protéases du *stratum corneum***

*Protocoles de référence :*

Préparation d'un extrait de protéase : **V-B.1** p.156

Tests d'activité : **V-B.3** p.157

Analyse par MALDI-TOF/TOF des sites de coupures *in vitro* : **V-B.4** p.158

Un extrait de protéines total a été obtenu à partir d'une poudre acétonique de *strippings* de la jambe. Pour vérifier que l'extrait de protéines présente bien une activité enzymatique, il a été testé avec succès sur des substrats commerciaux :

Le **test Enzcheck** générique réalisé à la fois à pH=5 et pH=8 permet de vérifier les activités globales de l'extrait protéique. Dans le cadre de protéases de la peau, il permet principalement de mettre en évidence les activités cathepsine à pH=5 et protéases à sérine à pH=8.

Le **test S2288** réalisé à pH=8 permet de tester l'activité des protéases à sérine et plus particulièrement l'activité tryptique.

Le **test S2586** réalisé à pH=8 permet de tester spécifiquement l'activité chymotryptique.

#### ***a Test enzymatique sur les peptides synthétiques de cornéodesmosine***

Une fois vérifiée l'activité enzymatique de l'extrait par ces trois tests, nous avons envisagé son activité sur les peptides de CDSN synthétiques. Les peptides synthétisés spécifiquement (**peptides S**) et aspécifiquement (**peptides NS**) se comportent différemment. En effet, pour ces derniers quasiment aucune variation de fluorescence n'est observée quand le peptide est mis en présence de l'extrait ou non et ce quelque soit le pH auquel est réalisé le test.

En revanche, mis à part pour le peptide S4, pour chaque peptide S, une variation spécifique de la fluorescence est mise en évidence seulement en présence de l'extrait (Figure 64) et particulièrement à l'un des pH d'essai. Cette variation est notée au bout **d'une heure seulement** d'incubation à 37°C, ce qui est relativement surprenant dans la mesure où pour les tests commerciaux, une nuit d'incubation est nécessaire pour observer une variation d'absorbance ou de fluorescence. Cette différence de comportement entre les peptides S et les peptides NS permet donc de conclure à **une dégradation enzymatique des « peptides S » 10 à 50 fois plus importante que pour les « peptides NS »**. Ceci vient donc confirmer nos résultats d'identification de peptides endogènes par LC-MS/MS. Les peptides identifiés en LC-MS/MS correspondent bien à une dégradation spécifique dans des zones privilégiées des protéines par des protéases endogènes et non des exoprotéases. D'autre part, chaque peptide S est

principalement dégradé soit à pH=5 soit à pH=8, ce qui vient là aussi, confirmer que les dégradations observées sont des protéolyses particulières due à des protéases différentes. Pour certains peptides, l'activité mise en évidence correspond bien aux clivages mis en évidence en LC-MS/MS. Ainsi nous avons identifié 2 sites tryptique (R/G) et chymotryptique (Y/R) sur le peptide CDSN3, ce qui est bien en accord avec la dégradation observée à pH basique. Cependant, il faut noter que pour d'autres peptides, l'activité principale n'est pas en accord avec nos suppositions : par exemple pour le peptide CDSN5, l'activité mise en évidence est une activité à pH acide alors que le seul site identifié sur ce peptide est un site Y/E *a priori* chymotryptique. Or, une recherche dans MEROPS montre que ce type de clivage peut effectivement correspondre à une activité chymotryptique mais également à une activité cathepsine (D ou L), ce qui serait donc le cas ici.

Il faut enfin remarquer que pour certains peptides S, la dégradation la plus faible observée est tout de même un peu plus importante que la dégradation des peptides NS ce qui impliquerait que plusieurs protéases seraient mises en jeu. Or, ceci peut être mis en corrélation avec nos données LC-MS/MS. Ainsi pour le peptide CDSN6, nous avons identifié 2 sites de clivages : un site Y/S de type chymotryptique pouvant donc correspondre à l'activité à pH=8 et un site T/Y que nous avons supposé correspondre à une activité de type cathepsine L, ce qui serait plutôt en accord avec l'activité à pH=5.

En ce qui concerne, le peptide CDSN4 ne présentant aucune dégradation *in vitro*, il est possible que la protéase (ou les protéases) impliquée(s) soit en présence de son inhibiteur dans l'extrait total et ne puisse donc pas dégrader le peptide. En outre, il ne faut pas oublier que ces peptides ne sont que des modèles d'étude. Il présente une structure 3D et une accessibilité différentes par rapport à la protéine entière ce qui peut expliquer que ces peptides ne soient pas dégradés *in vitro* de la même manière que la protéine *in vivo*.

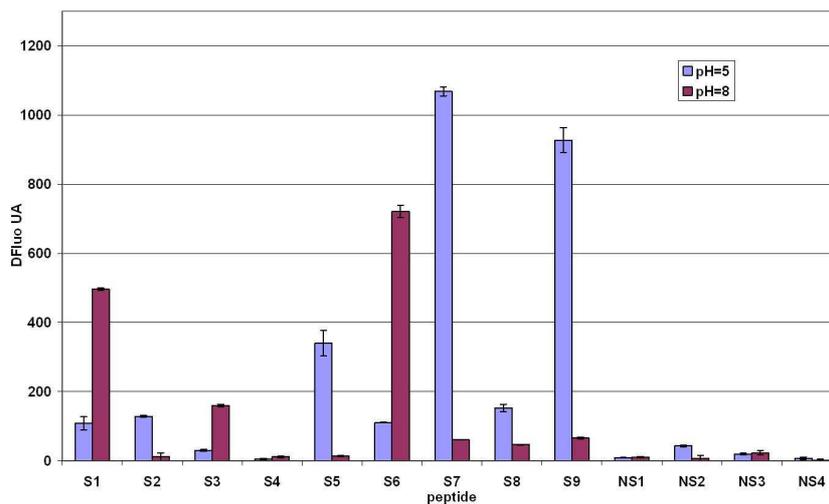


Figure 64 : Activité enzymatique d'un extrait total de protéines de la peau sur les peptides de cornéodesmosine de synthèse. Les mesures correspondent à la variation de fluorescence des peptides en présence ou non de l'extrait, mesurée après une heure d'incubation à 37°C.

#### ***b Vérification des sites de coupure in vitro par spectrométrie de masse***

Afin de vérifier que les activités mises en évidence généraient les mêmes sites de coupures *in vitro* que ceux mis en évidence *in vivo* par LC-MS/MS, chaque peptide mis en présence ou non de l'extrait de protéases a été analysé en MS par MALDI-TOF/TOF. Les profils de masses observés montrent que quand il n'y a pas d'extrait protéique ajouté, les formes majoritaires de peptides correspondent soit au peptide entier soit au peptide dont le groupe Dabcyl ou le groupe Edans a été dégradé. En présence de l'extrait de protéases, une différence de profil en fonction du pH auquel a été réalisé le test est observée. Ainsi pour le peptide CDSN1, les masses les plus intenses à pH acide restent des formes correspondant au peptide entier sans clivage interne alors qu'à pH basique, ces formes disparaissent au profit de peptides dans les basses masses qui correspondent au peptide clivé par une ou des protéases (Figure 65).

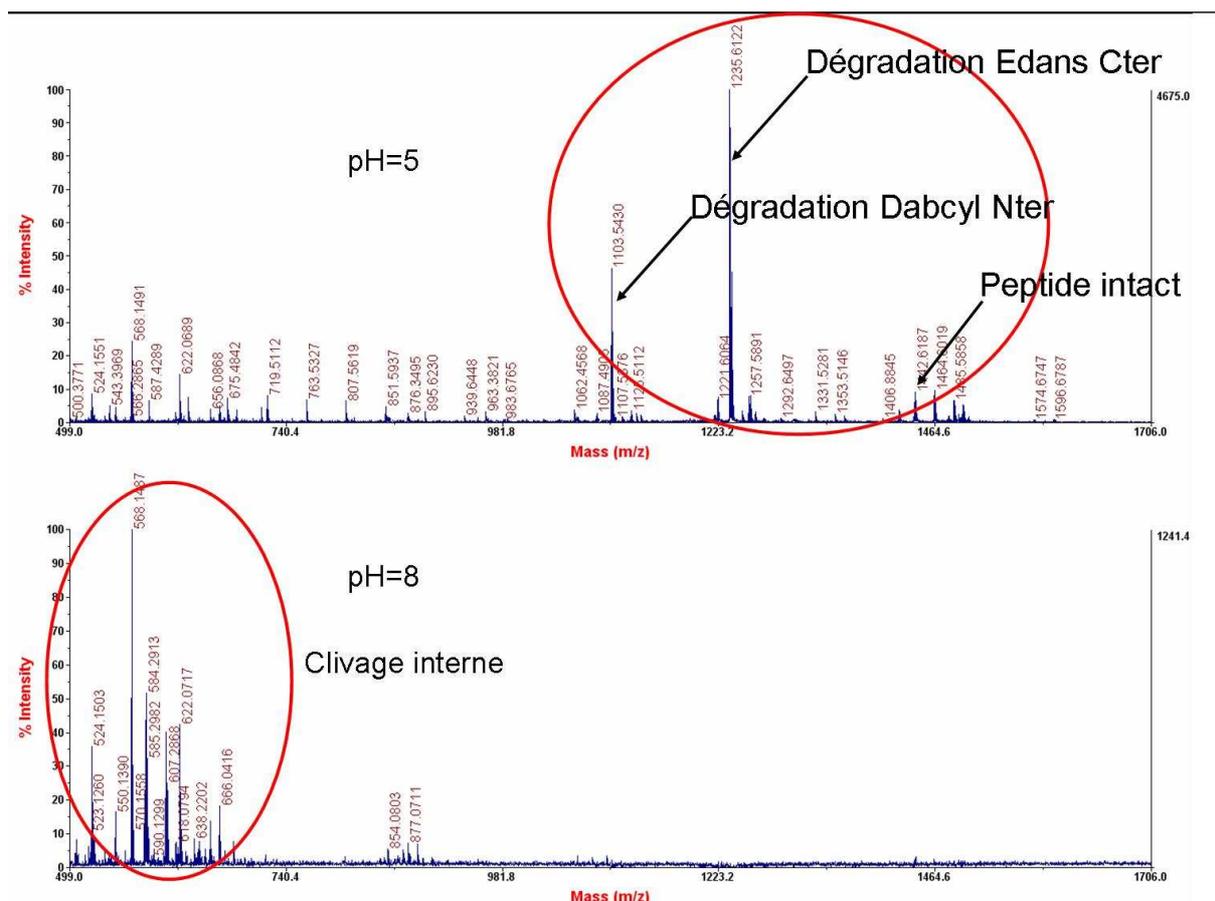


Figure 65 : Analyse MS du mélange CDSN1+extrait protéique à pH=5 et pH=8 en MALDI-TOF/TOF.

Pour identifier la séquence des différentes espèces peptidiques observées, nous avons réalisé une analyse en MS/MS de ces pics. Ainsi, les formes sans clivage interne, mais de masse plus faible que le peptide synthétisé, correspondent en fait à des formes où les groupes Dabcyll ou Edans sont dégradés. De plus, la fragmentation des espèces de plus basse masse nous a permis de mettre en évidence quels étaient les clivages enzymatiques mis en jeu et ainsi de vérifier qu'ils étaient en accord avec ceux identifiés par LC-MS/MS.

Pour le peptide CDSN1, la fragmentation du peptide de masse 584,29Da a permis de mettre en évidence un clivage interne entre l'acide aminé S et Y comme ce que nous avons identifié en LC-MS/MS (Figure 66). En revanche le deuxième clivage entre Y et S n'a pas pu être confirmé.

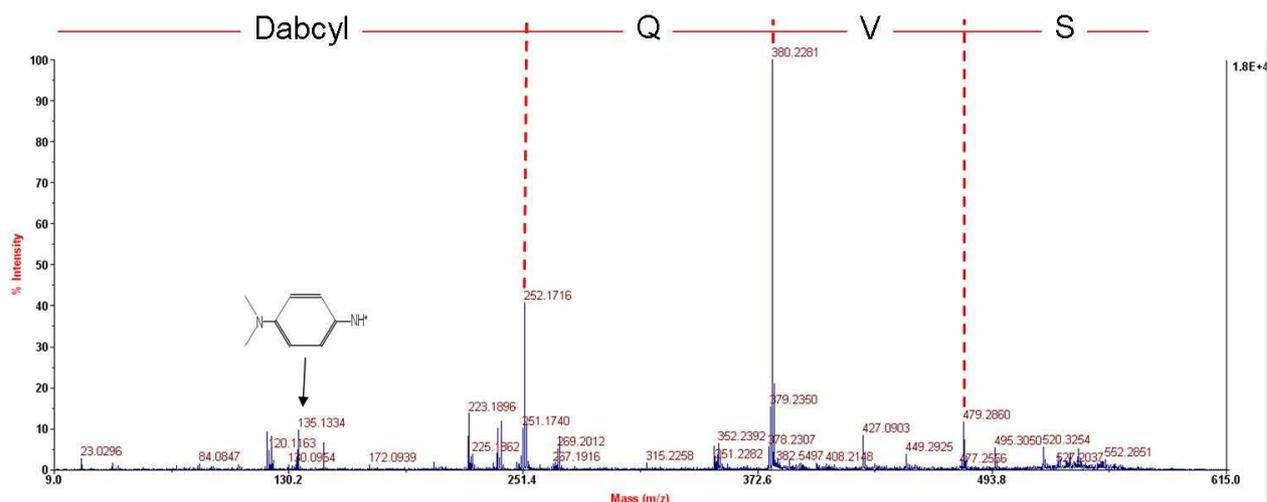


Figure 66 : Spectre de fragmentation de l'espèce 584,29Da qui apparaît dans les spectres MS du peptide CDSN1 lors de sa dégradation par un extrait de protéines du *stratum corneum* à pH basique.

### III-B.3.2. Activité d'un extrait fractionné par chromatographie

*Protocoles de référence :*

Préparation d'un extrait de protéase : **V-B.1** p.156

Fractionnement de l'extrait de protéase : **V-B.2** p.156

Tests d'activité : **V-B.3** p.157

Afin de séparer les protéases mises en jeu et/ou de les séparer de leurs inhibiteurs, il est possible de réaliser un fractionnement de l'extrait de protéines. Nous avons réalisé ce fractionnement, d'une part en fonction de leur masse sur une colonne d'exclusion stérique et d'autre part en fonction de leur charge (et donc de leur pI) sur une colonne d'échange de cations. Au cours de la séparation, différentes fractions de protéines ont été collectées et leur activité enzymatique a été testée sur les peptides modèles suivant le même protocole que l'extrait total. En parallèle, l'activité des fractions sur les substrats commerciaux a également été contrôlée.

Pour la plupart des peptides synthétisés, l'activité des fractions SCX et/ou SEC permet de vérifier une activité enzymatique préférentielle à pH acide ou basique et éventuellement de cibler la ou les protéases impliquées.

Globalement, les activités mises en évidence correspondent aux mêmes fractions que les fractions réactives sur les substrats commerciaux (Figure 67 et Figure 68).

# Peptides test

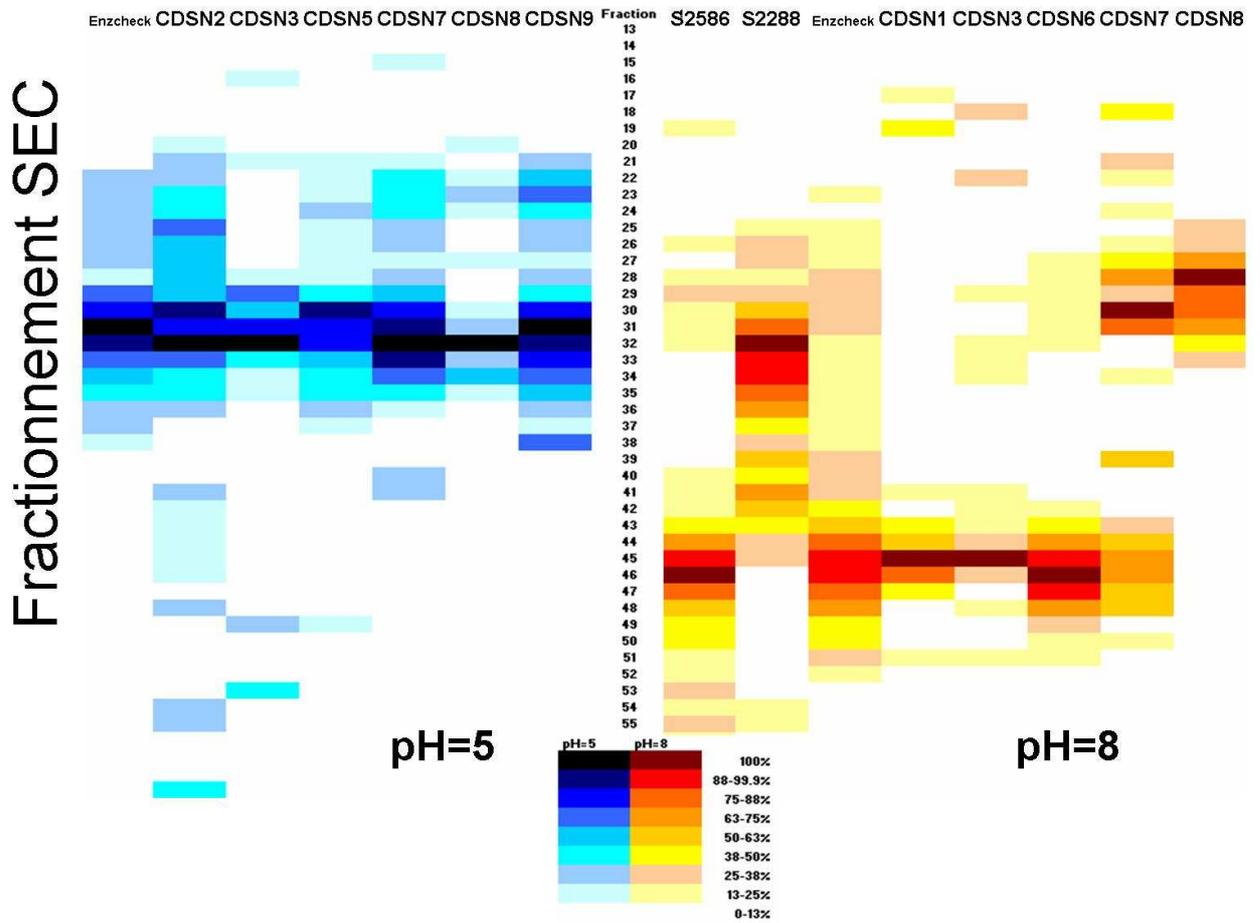


Figure 67 : Profil d'activité enzymatique des fractions obtenues après séparation par SEC d'un extrait total de protéines de *stratum corneum*. Seuls les peptides dégradés significativement sont présentés. Chaque série de données est normalisée.

# Peptides test

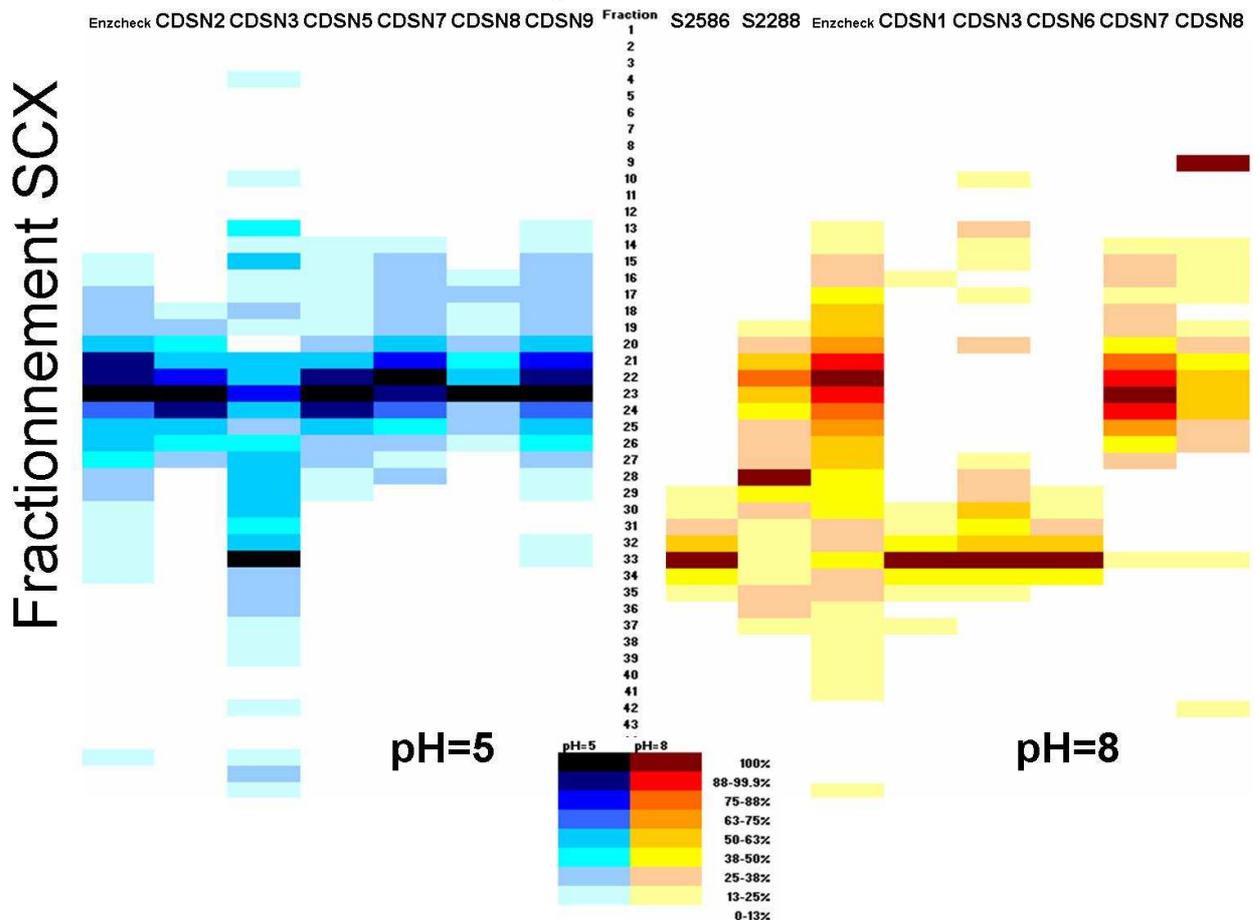


Figure 68 : Profil d'activité enzymatique des fractions obtenues après séparation par SCX d'un extrait total de protéines de *stratum corneum*.

Seuls les peptides dégradés significativement sont présentés. Chaque série de données est normalisée.

## ***a Exemple d'un peptide dégradé en condition basique***

Comme nous l'avons vu, le peptide CDSN1 est dégradé par l'extrait brut à pH basique. En comparant l'activité des fractions SCX ou SEC à pH basique sur le peptide CDSN1 et sur les peptides commerciaux, il apparaît une grande similitude avec l'activité mise en évidence par le test S2586. En particulier pour les fractions SCX, les deux profils sont assez superposables (Figure 69B). La protéase capable de dégrader le peptide CDSN1 serait donc la SCCE ce qui est assez original puisque le site mis en évidence par MALDI-TOF/TOF est le site S/Y, *a priori* non chymotryptique. L'ajout d'aprotinine (inhibiteur spécifique des protéases à sérine) sur les fractions SEC 43-48 actives a permis d'inhiber leurs activités et de confirmer cette activité chymotryptique.

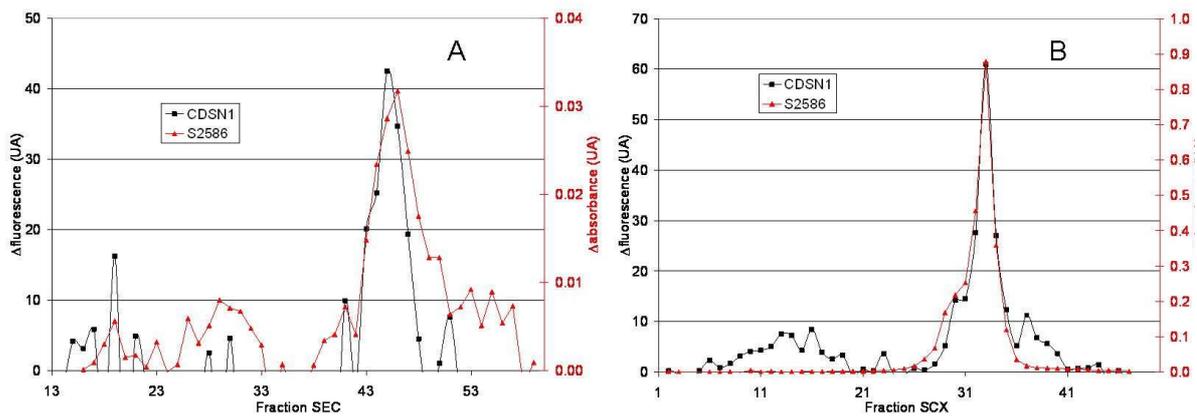


Figure 69 : Profil d'activité enzymatique des fractions obtenues après séparation d'un extrait de protéines de peau sur le peptide CDSN1 en condition basique.

A : Fractions SEC ; B : Fractions SCX. Dans les deux cas, l'activité mise en évidence présente une forte similitude avec l'activité sur le substrat spécifique de l'activité chymotryptique (S2586).

#### ***b Exemple d'un peptide dégradé en condition acide***

Le peptide CDSN7 présente une dégradation surprenante à pH acide par l'extrait brut alors que nous avions dans un premier temps supposé que les sites de clivages (Y/F et F/I) mis en évidence par LC-MS/MS correspondaient à une activité chymotryptique. L'activité des fractions SEC et SCX à pH acide montre qu'il s'agirait plutôt d'une activité de type cathepsine (Figure 70), ce qui est confirmé par le fait que ces activités sont inhibées par l'ajout de pepstatine (inhibiteur des protéases à acide aspartique). Cependant, le test Enzcheck sur les fractions SCX reste assez aspécifique et ne permet pas de distinguer les différentes isoformes. Les sites mis en évidence par LC-MS/MS pourraient donc correspondre à une activité de type cathepsine D originale. Cependant, si on fait une recherche dans la banque de données MEROPS, ces deux sites de clivage correspondraient plutôt à un clivage par la cathepsine E. Or ceci est aussi très original car cette protéase n'est pas supposée intervenir dans le phénomène de desquamation même si elle est présente dans l'épiderme. En effet, Igarashi *et al.* ont montré par immunofluorescence que la cathepsine D était présente au niveau des desmosomes contrairement à la cathepsine E : ils en ont déduit que seule la cathepsine D était impliquée dans la dégradation des desmosomes pendant le phénomène de desquamation [188]. Nos données ne permettent pas de trancher la question. D'autres expériences pourraient être menées avec un inhibiteur spécifique de la cathepsine E (API, inhibiteur de pepsine sécrété par l'*Ascaris*) par exemple ou en étudiant la dégradation du peptide CDSN7 par les deux protéases recombinantes.

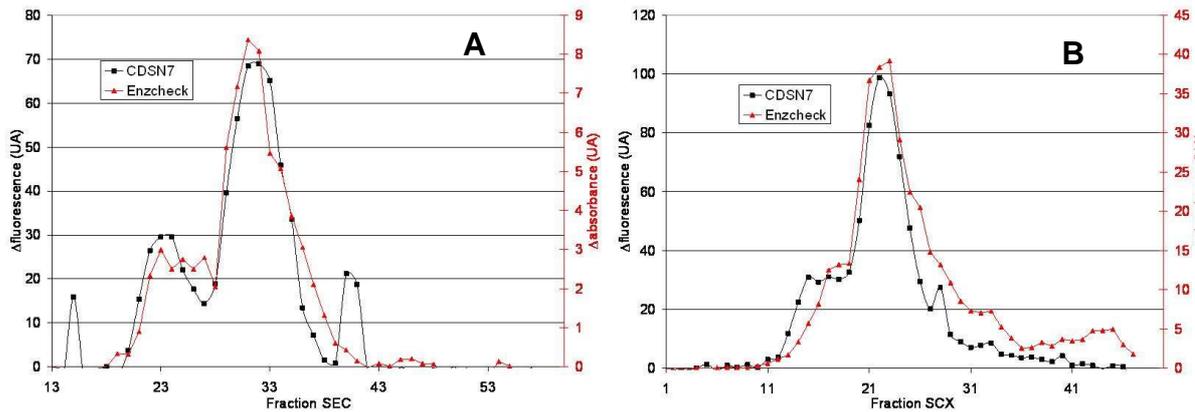
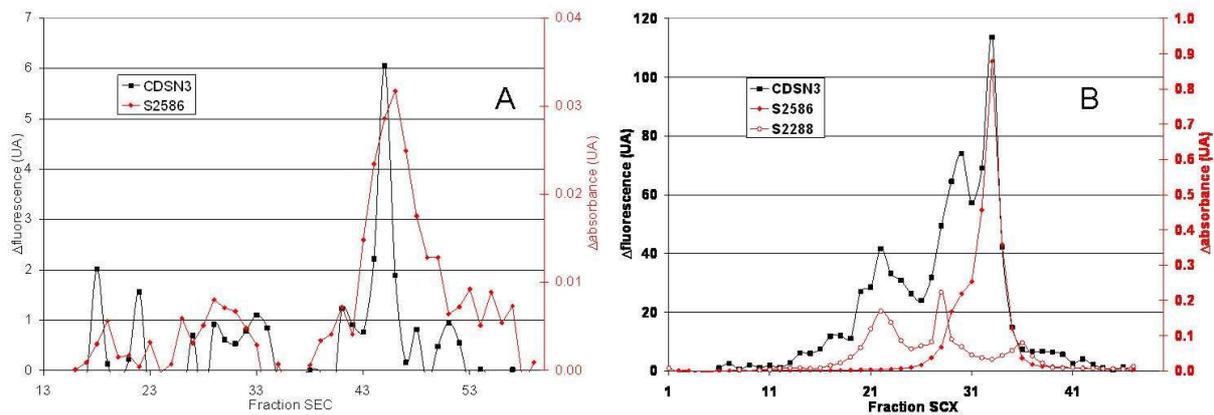


Figure 70 : Profil d'activité enzymatique des fractions obtenues après séparation d'un extrait de protéines de peau sur le peptide CDSN7 en condition acide.

A : Fractions SEC ; B : Fractions SCX. Dans les deux cas, l'activité mise en évidence est une activité de type cathepsine.

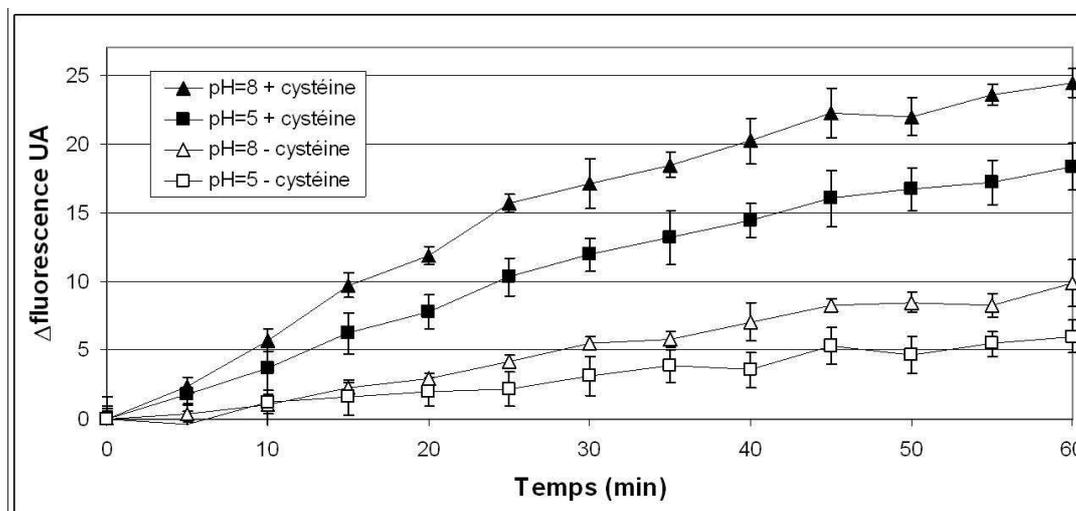
### c Exemple d'un peptide dégradé de manière originale

Le peptide CDSN3 présente un profil de dégradation assez particulier. Les peptides identifiés en LC-MS/MS sont *a priori* tryptique (R/G) et chymotryptique (Y/R). L'extrait brut permet de dégrader préférentiellement le peptide à pH basique, ce qui serait donc en accord avec les sites observés. Dans l'étude par MALDI-TOF/TOF des produits de dégradation de CDSN3, 3 sites de clivages ont été identifiés : 2 correspondent aux sites observés en LC-MS/MS et un site supplémentaire correspond à un clivage G/I. Ce site peut correspondre à la calpaïne-1 (tout comme le site Y/R). Les fractions SEC et SCX ne présentent pas des profils qui permettent de décider clairement quelles sont les protéases impliquées (Figure 71). En effet, les fractions SEC présentent une assez faible fluorescence qui pourrait tout de même correspondre à une activité de type SCCE (Figure 71A). Les fractions SCX, quant à elles, présentent un profil atypique (Figure 71B). En effet, plusieurs activités semblent être superposées : on observe un pic à la fraction 33 pouvant correspondre à la SCCE mais l'épaulement en fraction 30 est plus important que pour le test S2586. D'autre part, on observe également une activité au niveau de la fraction 22.



**Figure 71 : Profil d'activité enzymatique des fractions obtenues après séparation d'un extrait de protéines de peau sur le peptide CDSN3 en condition basique.**  
**A : Fractions SEC ; B : Fractions SCX.** En SEC, aucune activité importante n'est observée. En SCX, plusieurs activités semblent se superposer.

Pour caractériser ces activités, nous avons testé l'extrait brut et les fractions avec ou sans cystéine, pour tester l'activité des protéases à cystéine. On constate alors que la dégradation du peptide CDSN3 par l'extrait brut est activée à pH basique mais aussi à pH acide par la cystéine ce qui met en évidence l'activité d'une protéase à cystéine (Figure 72) qui pourrait donc être la calpaïne-1. Ce peptide est le seul, parmi les peptides synthétisés, dont la dégradation soit activée par la cystéine.



**Figure 72 : Influence de la cystéine sur la dégradation du peptide CDSN3 par un extrait brut de protéines du SC.** Quelque soit le pH, une dégradation accélérée est observée en présence de cystéine.

En ce qui concerne les fractions SCX, on montre que certaines fractions ne réagissent pas à l'ajout de cystéine (fractions 30 et 33) alors que d'autres sont cystéine-dépendantes (fractions 28, 32, 35) (Figure 73). Les fractions 30 et 33 correspondent aux fractions actives du test S2586 et confirmeraient donc l'activité SCCE alors que les autres fractions mettraient en évidence la (ou les) protéase(s) à cystéine.

Pour mieux caractériser ces activités, il serait nécessaire de réitérer le test avec et sans cystéine sur les fractions SEC.

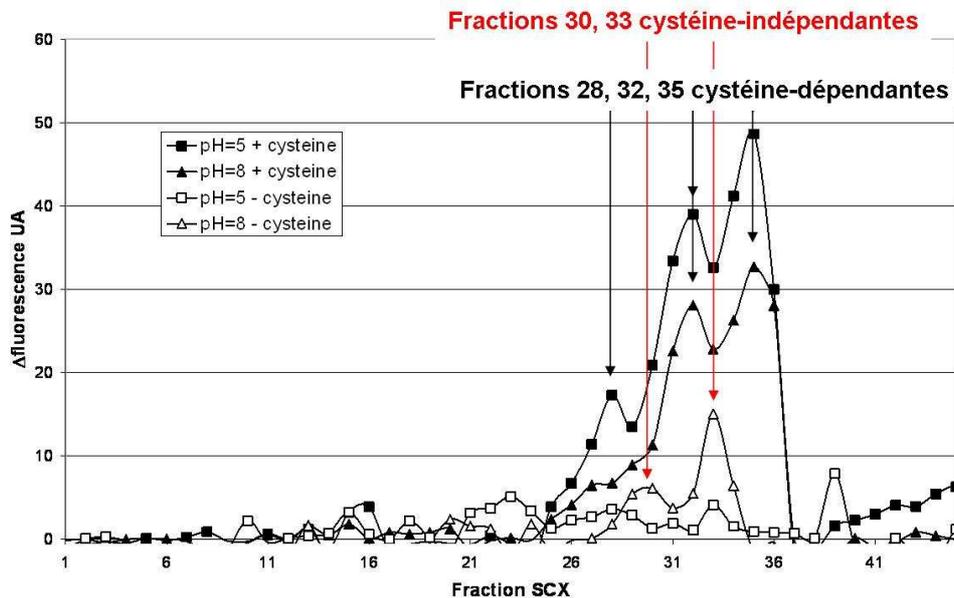


Figure 73 : Influence de la cystéine sur la dégradation du peptide CDSN3 par les fractions SCX. On constate un comportement différent selon les fractions : certaines sont cystéine-dépendantes, d'autres non.

Ces différents tests enzymatiques sur les peptides synthétiques de cornéodesmosine nous ont permis de confirmer que cette protéine est une protéine « hyper hydrolysable ». Plusieurs protéases semblent capables de la dégrader. Certaines activités, comme l'activité chymotryptique, ont été confirmées et d'autres hypothèses ont pu être formulées concernant des sites de clivage atypiques comme l'activité de la calpaïne-1 ou de la cathepsine E. De manière générale, ce type de stratégie peut être appliquée à d'autres protéines en synthétisant des peptides à partir des données LC-MS/MS. Ces peptides sont alors des outils de recherche permettant la découverte de nouvelles protéases ou d'envisager de nouvelles activités de protéases connues de la peau.