

DÉTECTION D'ACTIVITÉS PROTÉOLYTIQUES PAR ZYMOGRAPHIE *IN SITU*

Chrystelle BONNART

chrystelle.bonnart@inserm.fr

IRSD, Université de Toulouse, INSERM, INRA, ENVT, UPS, Toulouse, France
CHU Purpan BP3028, 31024 Toulouse Cedex 3, France

ABSTRACT

Proteases play essential roles in physiology and pathophysiology. To fully understand the function of a given protease, it is important to determine its cellular origin and thus be able to visualize its activity in the tissue. *In situ* zymography is an appropriate technique to answer these questions. To perform *in situ* zymography, unfixed tissue cryosections are incubated with a protein substrate bound to a quenched fluorochrome. Upon digestion of this substrate by endogenous proteases, cleavage products emit fluorescence, allowing their visualization by fluorescent imagery. Different types of proteolytic activities may be revealed according to the nature of the substrates, the composition of the buffer and the use of protease inhibitors. The interest of this technique is to be able to precisely localize protease activity within a tissue, and to correlate the intensity of this activity with a pathophysiological context. This approach is useful in different situations where active proteases are suspected to play a role, like in some skin and gut pathologies.

KEY WORDS

in situ zymography, proteases

RESUME

Les protéases jouent des rôles essentiels en physiologie et en physiopathologie. Pour bien comprendre la fonction d'une protéase donnée, il est important de déterminer son origine cellulaire et de pouvoir ainsi visualiser son activité dans les tissus. La zymographie *in situ* est une technique appropriée pour répondre à ces questions. Pour effectuer une zymographie *in situ*, des cryosections de tissus non fixés sont incubées avec un substrat protéique lié à un fluorochrome désactivé. Lors de la digestion de ce substrat par des protéases endogènes, les produits de clivage émettent de la fluorescence permettant leur visualisation par imagerie à fluorescence. Différents types d'activités protéolytiques peuvent être ainsi révélés en fonction de la nature des substrats, de la composition du tampon et de l'utilisation d'inhibiteurs de protéase. L'intérêt de cette technique est de pouvoir localiser précisément l'activité de la protéase dans un tissu et de corrélérer l'intensité de cette activité avec un contexte physiopathologique. Cette approche est utile dans différentes situations où les protéases actives sont soupçonnées jouer un rôle, comme dans certaines pathologies cutanées et digestives.

MOTS CLES

zymographie *in situ*, protéases

Les protéases, des acteurs essentiels en physiologie et physiopathologie

Les protéases sont des enzymes capables d'hydrolyser des liaisons peptidiques. Cette réaction enzymatique repose sur une attaque nucléophile effectuée par différents acides aminés qui déterminent la classe d'appartenance de la protéase. Ainsi, on distingue cinq grandes familles de protéases : les protéases à sérine, cystéine, thréonine, aspartate, et la famille des métalloprotéases dont l'activité nécessite un ion métallique comme co-facteur [1]. L'importance des protéases est d'abord soulignée par leur abondance. Environ 2% de nos gènes codent des protéases. Cela représente 533 protéases chez l'Homme et 628 chez la souris [2]. Les protéases jouent des rôles importants dans le maintien de l'homéostasie de tous les tissus. Elles sont en effet impliquées dans de multiples processus qui ne sont pas liés uniquement à la digestion des aliments. Elles peuvent participer à la croissance et la migration cellulaire, le remodelage tissulaire, la présentation d'antigène, la coagulation, la douleur, l'inflammation, etc... Ce rôle essentiel des protéases est mis en évidence par l'existence de nombreuses maladies génétiques (53 recensées) causées par des mutations dans des gènes codant des protéases [2]. A contrario, certaines protéases peuvent aussi être délétères pour l'organisme lorsqu'elles sont hyperactives et aujourd'hui, certaines cibles thérapeutiques sont des protéases. Par exemple des inhibiteurs du protéasome sont proposés dans des cas de myélomes et lymphomes, des inhibiteurs de thrombine et du Facteur Xa dans le cas de thrombose ou encore des inhibiteurs de l'enzyme de conversion de l'angiotensine (ACE) lors d'hypertension ou d'insuffisance cardiaque.

Etude des activités protéolytiques par zymographie

Les protéases sont régulées à de nombreux niveaux et existent sous plusieurs formes. Classiquement, les protéases sont d'abord produites sous une forme inactive appelée zymogène. Ce précurseur subit une maturation protéolytique qui va transformer le zymogène en une forme biologiquement active. En fonction des protéases, cette activation s'effectue via l'action d'une autre protéase ou via une auto-catalyse ou encore un changement de condition du milieu tel que le pH. La forme mature de la protéase peut être sous 2 états. L'enzyme peut être libre ou au contraire complexée à des inhibiteurs endogènes dont le rôle est d'empêcher l'activité protéolytique de l'enzyme. Ainsi, l'activité nette d'une protéase va directement dépendre du

niveau de protéases matures libres. La zymographie regroupe des approches expérimentales visant à mesurer des activités protéolytiques [3]. La zymographie de décline en diverses sous-catégories de méthodes qui reposent toutes sur le clivage d'un substrat protéique. La zymographie sur gel permet de déterminer de manière semi-quantitative l'activité de protéases ainsi qu'une information de la taille de la protéase active. Pour visualiser l'origine cellulaire et le niveau d'activité protéolytique au sein d'un tissu, la zymographie *in situ* est une approche de choix, objet du présent chapitre.

La zymographie *in situ*, une technique de choix pour visualiser l'activité protéolytique dans un tissu

Cette technique a été introduite en 1962 avec le développement des substrats protéiques fluorescents. Son principe est de visualiser la dégradation d'un substrat fluorescent (fluorescence faible avant clivage devenant intense après clivage) par les protéases endogènes d'un tissu.

MISE EN ŒUVRE EXPERIMENTALE

Les étapes du protocole expérimental sont illustrées dans la **Figure 1**.

• Congélation

La première étape consiste à congeler un tissu d'intérêt le plus rapidement possible afin de conserver les protéases sous forme active. Pour cela, les tissus fraîchement prélevés sont déposés dans un moule de congélation en plastique en tenant compte de l'orientation souhaité pour la coupe. Ils sont ensuite recouverts d'OCT (Optimal Cutting Temperature), milieu d'enrobage qui doit recouvrir entièrement le tissu et affleurer le bord du moule. A ce stade il faut éviter de trop bouger le tissu pour éviter les bulles dans l'OCT.

Le moule est ensuite plongé dans de l'isopentane refroidi dans de l'azote liquide. La température idéale se situe entre -80 et -100°C. Le moule doit être plongé pendant environ 1 minute, jusqu'à ce l'OCT soit complètement blanc et dur. Le bloc est ensuite conservé au -80°C jusqu'à la coupe.

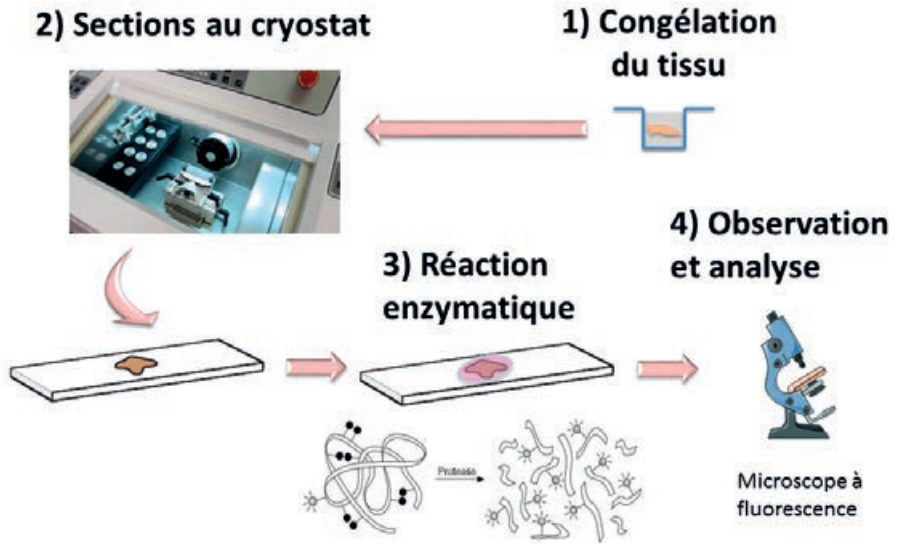


Figure 1 : Les grandes étapes de la zymographie *in situ*

La première étape de la zymographie *in situ* consiste à congeler très rapidement un tissu enrobé d'OCT dans de l'isopentane refroidi dans de l'azote liquide (température d'environ -80°C). Le bloc est ensuite coupé au cryostat à froid et déposé sur une lame en verre. Après séchage de la lame, une solution de substrat protéique ou peptidique est déposée sur l'échantillon et la lame est incubée plusieurs heures à 37°C en chambre humide. Durant cette incubation, le substrat est clivé par des protéases endogènes, ce qui libère des molécules fluorescentes visualisables en imagerie à fluorescence.

(Images adaptées de Vandooren J. et al. 2013 *Nature methods*, <https://geneq.com/biotechnology/en/product/amos-scientific/fully-automatic-cryostat-microtome-11182>, <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/mp06638.pdf>).

• Coupe au cryostat

La coupe des blocs de tissus est effectuée par un cryostat à -20°C . Les sections de $8\ \mu\text{m}$ d'épaisseur sont déposées sur des lames de verre et séchées à température ambiante pendant 2h.

• Préparation du substrat enzymatique

La zymographie *in situ* repose sur l'utilisation de substrats peptidiques ou protéiques liés à une molécule fluorescente dont l'intensité de fluorescence est très faible lorsque le substrat n'est pas clivé. Le clivage protéolytique du substrat génère la libération de molécules fluorescentes dont le signal est quantifiable. Selon le type de protéase à mettre en évidence, différents substrats existent dans le commerce. Par exemple, on peut utiliser « EnzChek Protease Assay Kit » pour les protéases à sérine ou « EnzChek Gelatinase/collagenase Assay Kit » pour les métalloprotéases. Ces 2 kits de Molecular probes contiennent respectivement de la caséine et de la gélatine/collagène comme substrats protéolytiques, et le tampon d'activité est fourni dans le kit. Sur le même principe, il est également possible d'utiliser des petits substrats peptidiques (2 – 5 acides aminés) préférentiels d'une famille de protéases ou d'un type de protéases (voir **Tableau 1**). Un grand nombre de substrats peptidiques fluorescents sont disponibles chez le fournisseur Bachem.

Nature de l'activité protéolytique	Substrat	Tampon d'activité	Inhibiteurs
Protéases à sérine	Caséine	50mM Tris-Cl pH8 - CaCl ₂	AEBSF
Trypsines	Gly-Pro-Arg		Leupeptine
Chymotrypsines	Ala-Ala-Pro-Met		Chymostatine
Elastases	Ala-Ala-Pro-Val		Elastatinal
Métalloprotéases	Gélatine / collagène	50mM tris-Cl pH 7.6 - 150mM NaCl - 5 mM CaCl ₂	EDTA
Protéases à cystéine	Phe-Arg	100mM Phosphate de potassium pH6 - 1mM DTT - 10mM EDTA	E64

Tableau 1 : Activités protéolytiques : Substrats préférentiels, tampon d'activité et inhibiteurs de protéases pour les principales classes de protéases.

Le substrat est préparé dans un tampon d'activité approprié (voir **Tableau 1**) et mélangé à une solution d'agarose « low melting » (SIGMA) 0,3% à 37°C. Après homogénéisation et toujours à 37°C, cette solution de substrat est déposée sur le tissu.

• Réaction enzymatique

La lame est plongée dans une solution de PBS-Tween 2% pour éliminer l'OCT, puis rincée en PBS. Les échantillons sont ensuite cerclés avec un stylo hydrophobe pour délimiter la zone de dépôt.

Après le dépôt de la solution d'agarose-substrat sur la lame, celle-ci est refroidie quelques minutes à 4°C pour que l'agarose gélifie, puis la lame est laissée quelques heures (2 à 6h) à 37°C dans une chambre humide. Pendant ce temps d'incubation, les enzymes endogènes présentes et actives dans le tissu vont pouvoir cliver le substrat et ainsi libérer des molécules fluorescentes au niveau des compartiments cellulaires où ces protéases actives sont exprimées. A la fin de ce temps d'incubation, si besoin, une solution de DAPI ou Topro-3 est déposée 10 minutes dans la goutte semi-liquide d'agarose, ce qui permettra la visualisation des noyaux. La réaction enzymatique se déroulant dans le tissu, la fluorescence n'est pas présente au niveau de la goutte d'agarose qui est ensuite éliminée par glissement pour permettre le montage. Les lames sont alors montées dans un milieu de montage recouvert d'une lamelle de verre.

• Observation en microscopie à fluorescence

Les échantillons sont ensuite observés à l'aide d'un microscope à fluorescence confocal ou à champ large, selon la résolution souhaitée. La localisation et le niveau de fluorescence sont analysés par des logiciels d'analyse d'image (ImageJ) afin de déterminer l'origine du signal et l'intensité de l'activité protéolytique.

Le choix du substrat et du tampon va déterminer la famille de protéases que l'on souhaite mettre en évidence. Il est également possible de rajouter des inhibiteurs de protéases irréversibles qui sont alors rajoutés sur la coupe 15 min avant le dépôt du substrat, et qui vont renseigner sur la spécificité du signal et permettront le cas échéant d'affiner le type de protéases actives en présence.

APPLICATIONS

Cette technique permet d'explorer le niveau de protéases actives dans des tissus sains et pathologiques. Par exemple, la ZIS a été utilisée pour mieux comprendre la physiopathologie du syndrome de Netherton, une génodermatose rare de l'enfant. Cette maladie est causée par des mutations dans le gène *SPINK5* qui code un inhibiteur de protéase à sérine, LEKTI. La ZIS a permis de mettre en évidence une augmentation de l'activité des protéases à sérine, notamment de type trypsique, dans des coupes de peau de souris KO *Spink5* (**Figure 2**) [4]. Un autre exemple est illustré par les MICI, Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin, où il a été mis en évidence une augmentation d'activité élastolytique dans l'épithélium colique de ces patients (**Figure 3**) [5].

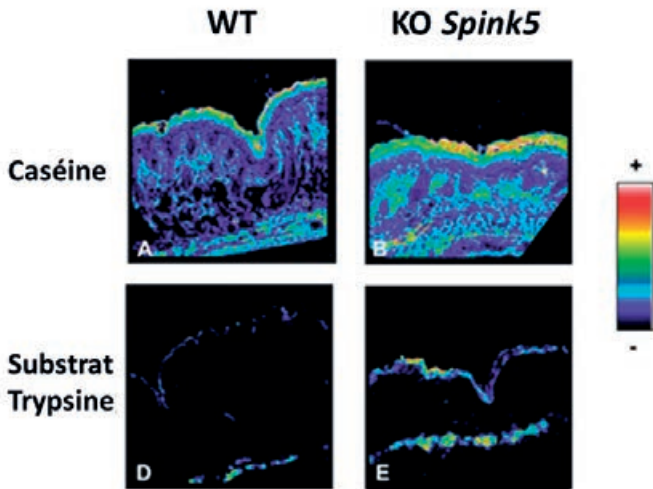


Figure 2 : Zymographie in situ sur coupes de peau de souris WT et KO pour *Spink5*

Expérience de ZIS réalisée sur des coupes de peau de souris génétiquement invalidées pour un inhibiteur de protéase, *Spink5*. L'intensité de fluorescence est représentée par une échelle en pseudo-couleur représentée à droite. Deux substrats différents ont été utilisés, montrant l'augmentation des protéases à sérine (substrat caséine) et l'augmentation des activités trypsiniques dans la peau des animaux KO, et plus particulièrement dans le compartiment épidermique (partie la plus superficielle de la peau, orientée en haut sur les images). Images adaptées de Deraison C. et al. 2007 Mol. Biol. Cell.

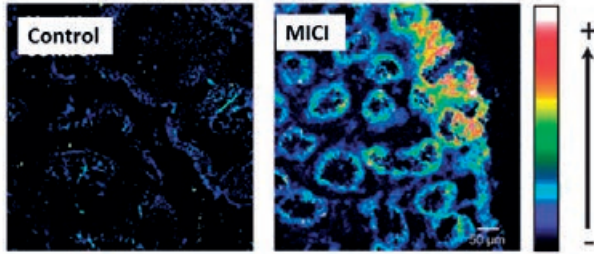


Figure 3 : Zymographie *in situ* sur coupes de peau humaine issue de patient témoin et patient atteint de maladie inflammatoire chronique de l'intestin.

Expérience de ZIS montrant une augmentation de l'activité élastolytique dans l'épithélium colique de patient atteint de maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) en comparaison avec un patient contrôle. Images adaptées de Motta JP et al. 2012 Sci. Transl. Med.

L'utilisation de plusieurs types de substrats fluorescents (substrats protéiques à large spectre tels que la caséine ou gélatine ou substrats peptidiques spécifiques de certains sous-types de protéases) permet d'explorer le type de protéases dont l'activité est dérégulée dans les tissus pathologiques. La ZIS permet aussi d'effectuer du criblage d'inhibiteurs de protéases vis-à-vis des protéases endogènes produites par le tissu. Cette approche peut être intéressante pour étudier la capacité d'inhibiteurs pharmacologiques à inhiber l'activité de protéases-cibles dans leur contexte biologique naturel.

Les principaux développements autour de la technique de ZIS se concentrent sur les substrats employés. Aujourd'hui, 2 grands types de substrats sont utilisés (protéines entières ou peptides synthétiques). Il existe un composé nommé ABP (Activity-Based Probe) qui se compose d'une extrémité mimant un substrat et d'une autre extrémité correspondant à une étiquette fluorescente. L'avantage de ce composé est qu'il se fixe de manière covalente sur le site actif de l'enzyme cible. Ainsi, après fixation de la sonde sur sa protéase-cible, on détectera la fluorescence de la sonde en imagerie à fluorescence, comme pour un substrat classique. L'avantage des ABP par rapport aux substrats classiques est que la réaction ne requiert pas de clivage, ce qui limite la diffusion de la fluorescence et donc permet d'améliorer la précision de localisation. En revanche, cette approche est moins sensible dans la mesure où chaque protéase active est détectée par une seule molécule d'ABP (pas de système d'amplification).

CONCLUSION

Etant donné le rôle essentiel des protéases dans de très nombreux processus biologiques fondamentaux, il est important d'avoir des outils pour étudier l'activité protéolytique de ces enzymes. La zymographie *in situ* est une technique qui permet de localiser et de quantifier les protéases actives dans un tissu. C'est une technique facile à mettre en œuvre dans un laboratoire de recherche mais qui nécessite une grande rigueur dans la préparation du tissu, et une réflexion sur la nature du substrat, du tampon et d'éventuels inhibiteurs à employer en fonction de la classe ou sous-classe de protéase(s) que l'on souhaite mettre en évidence.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. TURK, B., Targeting proteases: successes, failures and future prospects. *Nat Rev Drug Discov*, 2006. 5(9): p. 785-99.
2. PUENTE, X.S., L.M. SANCHEZ, C.M. OVERALL, and C. LOPEZ-OTIN, Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet*, 2003. 4(7): p. 544-58.
3. VANDOOREN, J., N. GEURTS, E. MARTENS, P.E. VAN DEN STEEN, and G. OPDENAKKER, Zymography methods for visualizing hydrolytic enzymes. *Nat Methods*, 2013. 10(3): p. 211-20.
4. DERAISON, C., C. BONNART, F. LOPEZ, C. BESSON, R. ROBINSON, A. JAYAKUMAR, F. WAGBERG, M. BRATTSAND, J.P. HACHEM, G. LEONARDSSON, and A. HOVNANIAN, LEKTI fragments specifically inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and control desquamation through a pH-dependent interaction. *Mol Biol Cell*, 2007. 18(9): p. 3607-19.
5. MOTTA, J.P., L.G. BERMUDEZ-HUMARAN, C. DERAISON, L. MARTIN, C. ROLLAND, P. ROUSSET, J. BOUE, G. DIETRICH, K. CHAPMAN, P. KHARRAT, J.P. VINEL, L. ALRIC, E. MAS, J.M. SALLENAVE, P. LANGELLA, and N. VERGNOLLE, Food-grade bacteria expressing elafin protect against inflammation and restore colon homeostasis. *Sci Transl Med*, 2012. 4(158): p. 158ra144.