

Résumé de thèse de doctorat

Le Facteur Nucléaire- κ B et la Protéine Activatrice-1 : rôles et potentiel en tant que cibles thérapeutiques dans l'inflammation asthmatique

Nuclear Factor- κ B and Activator Protein-1 : roles and potential as therapeutic targets in asthmatic inflammation

CANDIDAT : **Christophe Desmet**

PROMOTEUR : **Professeur P. Lekeux**

CO-PROMOTEUR : **Docteur F. Bureau**

Département et Service

Département des Sciences Fonctionnelles, Service de Physiologie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique

Date de la défense publique : 26 janvier 2005

Composition du Jury

• MEMBRES EXTÉRIEURS À LA FACULTÉ :

Professeur V. Bours, CHU Liège, Belgique

Professeur R. Louis, CHU Liège, Belgique

Professeur B. Staels, Institut Pasteur Lille, France

Professeur A.-B. Tonnel, CHU Lille, France

• MEMBRES INTERNES À LA FACULTÉ DE MÉDECINE VÉTÉRINAIRE :

Docteur F. Bureau, Docteur C. Clercx, Professeur M. Georges, Professeur J.-M. Godeau, Professeur P. Gustin, Professeur P. Lekeux, Docteur A. Vanderplasschen

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

L'asthme affecte 155 millions de personnes de par le monde et sa prévalence ne cesse de croître, en dépit des progrès de la médecine. L'asthme est une maladie inflammatoire chronique des voies respiratoires caractérisée par des épisodes récurrents de toux et de sifflement. Sa pathogenèse est étroitement liée à une réponse inflammatoire allergique orchestrée par des lymphocytes T auxiliaires de type 2 (Th2). Les cellules immunes (mastocytes, éosinophiles...) mais aussi les cellules structurales du poumon jouent également un rôle important dans cette inflammation (Bousquet *et al.*, 2000).

L'inflammation asthmatique se caractérise par la surexpression, dans les voies respiratoires, d'un grand nombre de protéines pro-inflammatoires (enzymes inflammatoires, chimiokines, cytokines pro-inflammatoires, molécules d'adhésion), ainsi que de cytokines de type Th2 (Interleukine (IL)-4, IL-5, IL-13...) (Barnes *et al.*, 1998). Cette surexpression est le résultat d'un accroissement de l'expression génique ; la plupart des gènes inflammatoires et des gènes codant pour les cytokines Th2 dont l'expression est accrue dans l'asthme n'étant que faiblement ou pas du tout exprimés chez les sujets sains (Barnes *et al.*, 1998). Ceci suggère donc que certains facteurs

de transcription (protéines régulant l'expression génique), jouent un rôle clé dans la pathogenèse de l'asthme en induisant l'expression des gènes inflammatoires et des gènes codant pour les cytokines Th2 qui caractérise cette maladie.

Différents facteurs de transcription se sont ainsi vus attribuer un rôle dans la pathogenèse de l'asthme (Desmet *et al.*, 2004a). Parmi ceux-ci le Facteur Nucléaire- κ B (NF- κ B) et la Protéine Activatrice-1 (AP-1) semblent revêtir une importance particulière, basée sur les observations suivantes :

- 1) quasi tous les gènes codant pour les protéines inflammatoires dont l'expression est accrue dans

l'asthme possèdent des éléments de régulation pour les facteurs AP-1 et/ou NF- κ B au sein de leur promoteur (Barnes et Adcock, 1998);

- 2) les glucocorticoïdes, le traitement le plus efficace de l'asthme, sont entre autres des inhibiteurs de l'activité de NF- κ B et d'AP-1 (Schüle *et al.*, 1990 ; Caldenhoven *et al.*, 1995);
- 3) une expression accrue de c-fos, un composant d'AP-1, a été enregistrée dans l'épithélium de patients souffrant d'asthme comparés à des sujets sains (Demoly *et al.*, 1992);
- 4) une corrélation étroite existe entre le degré d'activité de NF- κ B dans les bronches et la dysfonction pulmonaire chez des animaux souffrant d'asthme (Bureau *et al.*, 2000a);
- 5) l'activité de NF- κ B est persistante et non pas transitoire, dans les maladies asthmatiques (Hart *et al.*, 1998 ; Bureau *et al.*, 2000b);
- 6) les animaux déficients pour certaines sous-unités de NF- κ B ou d'AP-1 ne développent pas d'asthme dans un modèle murin (Yang *et al.*, 1998 ; Donovan *et al.*, 1999 ; Das *et al.*, 2001 ; Hartenstein *et al.*, 2002).

Les études sur les souris déficientes pour des sous-unités de NF- κ B ou d'AP-1 ont permis de démontrer que ces facteurs jouent un rôle essentiel dans la phase de sensibilisation menant à l'asthme en permettant le développement des lymphocytes Th2. Cependant, malgré l'abondance des données préliminaires, les questions de savoir si NF- κ B et AP-1 jouent un rôle et présentent un potentiel en tant que cible thérapeutique dans la phase effectrice de l'inflammation asthmatique sont restées sans réponse. Le but du présent travail était de répondre à ces deux questions.

RÉSULTATS

La difficulté de la démonstration du rôle de NF- κ B ou d'AP-1 dans l'asthme réside essentiellement dans l'absence d'inhibiteurs pharmacologiques adéquats. Dans une étude préliminaire, nous avons étudié des inhibiteurs physiologiques de l'activité de NF- κ B nouvellement découverts ; les prostaglandines

à noyau cyclopenténone (cyPGs) (Straus et Glass, 2001). Nous avons testé le potentiel anti-inflammatoire de ces composés dans un modèle de cellules épithéliales pulmonaires (cellules A549) stimulées par la cytokine pro-inflammatoire TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*). Dans ces cellules, des doses élevées de cyPGs ont conduit à une inhibition significative de l'activité de NF- κ B mais pas d'AP-1. Cette inhibition de l'activité de NF- κ B était associée à une réduction de l'expression de différents cytokines pro-inflammatoires par les cellules A549 stimulées au TNF- α . Cependant, à des concentrations inférieures à celles requises pour l'inhibition de l'activité de NF- κ B, le traitement par les cyPGs a conduit à une potentialisation de l'expression des cytokines inflammatoires par les cellules A549 stimulées au TNF- α . Des résultats similaires ont été obtenus dans d'autres types cellulaires. Ces résultats ont remis en cause le potentiel anti-inflammatoire des cyPGs dans certaines circonstances (Bureau *et al.*, 2002). Cette étude a également montré que les effets pro-inflammatoires observés des cyPGs étaient dus à un stress oxydant généré par les cyPGs. Ces effets étaient donc totalement non spécifiques et ne faisaient pas intervenir les cibles classiquement identifiées des cyPGs.

Ce qui précède illustre la difficulté et les biais liés à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques, fussent-ils d'origine physiologique, dans l'étude des facteurs de transcription (voir aussi, pour illustration, une autre étude de notre laboratoire ; Desmet *et al.*, 2005a). Les cyPGs, de même que l'ensemble des autres inhibiteurs pharmacologiques rapportés de NF- κ B ou d'AP-1, présentent une spécificité insuffisante (souvent liée à une toxicité trop élevée) les rendant impropres pour l'étude de ces facteurs de transcription.

Afin d'éviter les problèmes liés aux inhibiteurs pharmacologiques évoqués ci-dessus, nous avons utilisé dans les expériences ultérieures une méthode assurant l'inhibition spécifique de l'activité de NF- κ B ou d'AP-1 : l'utilisation de leurres deoxyribonucléiques. Les leurres sont des oligodeoxynucléotides double-brin (ODN) synthétiques contenant la séquence consensus de liaison à l'ADN d'un facteur de transcription (Bielinska *et al.*, 1990). Une fois

entrés dans les cellules, ces decoys empêchent l'interaction authentique entre le facteur de transcription cible et l'ADN génomique, entraînant ainsi l'inhibition de l'expression génique.

Afin de déterminer le rôle et le potentiel en tant que cibles thérapeutiques dans la phase effectrice de l'inflammation asthmatique, les effets de l'inhibition spécifique de NF- κ B et d'AP-1 par administration de leurres ont été étudiés dans un modèle murin d'asthme. Des souris «asthmatiques», c'est à dire sensibilisées puis exposées à de l'ovalbumine (OVA) en aérosol, ont été traitées par administration intratrachéale de leurres dirigés contre NF- κ B (leurres NF- κ B) ou dirigés contre AP-1 (leurres AP-1). L'administration de leurres NF- κ B ou de leurres AP-1 a permis de réduire significativement l'activité de NF- κ B ou d'AP-1, respectivement, dans les poumons de souris sensibilisées puis exposées à l'OVA (Desmet *et al.*, 2004c ; 2005b). L'inhibition de NF- κ B a permis de réduire fortement les paramètres inflammatoires dans le poumon des souris «asthmatiques» (éosinophilie, sécrétion d'IL-5, d'IL-13 et d'éotaxine dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire, sécrétion de mucus...), ainsi que l'HRB mais n'a pas conduit à une diminution des taux d'IgE circulantes, ni de la sécrétion d'IL-4 dans les liquides de lavage broncho-alvéolaire (Desmet *et al.*, 2005a). L'inhibition spécifique d'AP-1 a quant à elle conduit à une réduction de l'ensemble des signes d'inflammation dans les poumons de souris «asthmatiques» (éosinophilie, cytokines Th2 dont l'IL-4, sécrétion de mucus...), ainsi que de l'HRB et des taux d'IgE circulantes totales et spécifiques de l'allergène (Desmet *et al.*, 2004c).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

En conclusion, il ressort des études décrites ci-dessus que les facteurs de transcription NF- κ B et AP-1 jouent un rôle dans la phase effectrice de l'inflammation asthmatique. Il apparaît également que l'inhibition spécifique de NF- κ B ou d'AP-1 pourrait présenter un potentiel thérapeutique dans le traitement de l'asthme. De manière surprenante, il semblerait que l'inhibition d'AP-1 serait plus efficace que l'inhibition de NF- κ B dans le contrôle

de l'inflammation asthmatique, l'inhibition d'AP-1 conduisant en effet à une inhibition de tous les paramètres inflammatoires chez les souris asthmatiques, ce qui n'est pas le cas chez les souris traitées par les leurres NF- κ B. Des études complémentaires sont nécessaires afin de confirmer ces résultats, notamment chez l'humain. Le développement d'inhibiteurs

spécifiques adéquats de NF- κ B et d'AP-1 est un préalable indispensable à la poursuite des recherches sur le potentiel thérapeutique de l'inhibition de ces facteurs de transcription dans l'asthme.

REMERCIEMENTS

Je remercie le Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS, Belgium) pour m'avoir permis de réaliser le présent travail sous ses auspices. Je remercie également UCB Pharma et le Ministère de la Région wallonne pour le financement partiel de certaines des études réalisées.

RÉFÉRENCES

- BARNES P.J., CHUNG K.F., PAGE C.P. Inflammatory mediators of asthma: an update. *Pharmacol. Rev.*, 1998, **50**, 515-596.
- BARNES P.J., ADCOCK I.M. Transcription factors and asthma. *Eur. Respir. J.*, 1998, **12**, 221-234.
- BIELINSKA A., SHIVDASANI R.A., ZHANG L.Q., NABEL G.J. Regulation of gene expression with double-stranded phosphorothioate oligonucleotides. *Science*, 1990, **250**, 997-1000.
- BOUSQUET J., JEFFERY P.K., BUSSE W.W., JOHNSON M., VIGNOLA A.M. Asthma: from bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000, **161**, 1720-1745.
- BUREAU F., BONIZZI G., KIRSCHVINK N., DELHALLE S., DESMECHT D., MERVILLE M.P., BOURS V., LEKEUX P. Correlation between nuclear factor-kappaB activity in bronchial brushing samples and lung dysfunction in an animal model of asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2000, **161**, 1314-1321.
- BUREAU F., DELHALLE S., BONIZZI G., FIEVEZ L., DOGNE S., KIRSCHVINK N., VANDERPLASSCHEN A., MERVILLE M.P., BOURS V., LEKEUX P. Mechanisms of persistent NF-kappa B activity in the bronchi of an animal model of asthma. *J. Immunol.*, 2000, **165**, 5822-5830.
- CALDENHOVEN E., LIDEN J., WISSINK S., VAN DE STOLPE A., RAAIJMAKERS J., KOENDERMAN L., OKRET S., GUSTAFSSON J.A., VAN DER SAAG P.T. Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for the antiinflammatory action of glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.*, 1995, **9**, 401-412.
- DEMOLY P., BASSET-SEGUIN N., CHANEZ P., CAMPBELL A.M., GAUTHIER-ROUVIERE C., GODARD P., MICHEL F.B., BOUSQUET J. c-fos proto-oncogene expression in bronchial biopsies of asthmatics. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 1992, **7**, 128-133.
- DAS J., CHEN C.H., YANG L., COHN L., RAY P., RAY A. A critical role for NF-kappa B in GATA3 expression and TH2 differentiation in allergic airway inflammation. *Nat. Immunol.*, 2001, **2**, 45-50.
- DONOVAN C.E., MARK D.A., HE H.Z., LIOU H.C., KOBZIK L., WANG Y., DE SANCTIS G.T., PERKINS D.L., FINN P.W. NF-kappa B/Rel transcription factors: c-Rel promotes airway hyperresponsiveness and allergic pulmonary inflammation. *J. Immunol.*, 1999, **163**, 6827-6833.
- HART L.A., KRISHNAN V.L., ADCOCK I.M., BARNES P.J., CHUNG K.F. Activation and localization of transcription factor, nuclear factor-kappaB, in asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1998, **158**, 1585-1592.
- HARTENSTEIN B., TEURICH S., HESS J., SCHENKEL J., SCHORPP-KISTNER M., ANGEL P. Th2 cell-specific cytokine expression and allergen-induced airway inflammation depend on JunB. *EMBO J.*, 2002, **21**, 6321-6329.
- SCHULER., RANGARAJAN P., KLIEWERS S., RANSONE L.J., BOLADO J., YANG N., VERMA I.M., EVANS R.M. Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell*, 1990, **62**, 1217-1226.
- STRAUSD.S., GLASS C.K. Cyclopentenone prostaglandins: new insights on biological activities and cellular targets. *Med. Res. Rev.*, 2001, **21**, 185-210.
- YANG L., COHN L., ZHANG D.H., HOMER R., RAY A., RAY P. Essential role of nuclear factor kappaB in the induction of eosinophilia in allergic airway inflammation. *J. Exp. Med.*, 1998, **188**, 1739-1750.

PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE

- BUREAU F.*, DESMET C.*, MELOTTE D., JASPAR F., VOLANTI C., VANDERPLASSCHEN A., PASTORET P.P., PIETTE J., LEKEUX P. A proinflammatory role for the cyclopentenone prostaglandins at low micromolar concentrations: oxidative stress-induced extracellular signal-regulated kinase activation without NF-kappa B inhibition. *J. Immunol.*, 2002, **168**, 5318-5325. (*co-premiers auteurs)
- DESMET C., LOUIS R., LEKEUX P., BUREAU F. Le contrôle de l'expression génique en tant que nouvelle cible thérapeutique dans le traitement de l'asthme. *Rev. Med. Liège*, 2004a, **60**, 789-795.
- DESMET C., GOSSET P., PAJAK B., CATALDO D., BENTIREN-ALJ M., LEKEUX P., BUREAU F. Selective blockade of NF-kappaB activity in airway immune cells inhibits the effector phase of experimental asthma. *J. Immunol.*, 2004c, **173**, 5766-5775.
- DESMET C., WARZÉE B., GOSSET P., MÉLOTTE D., RONGVAUX A., GILLET L., FIÉVEZ L., SEUMOIS G., VANDERPLASSCHEN A., STAELS B., LEKEUX P., BUREAU F. Pro-inflammatory properties for thiazolidinediones. *Biochem. Pharmacol.*, 2005a, **69**, 255-265.
- DESMET C., GOSSET P., JASPAR F., MÉLOTTE D., GARZÉ V., PAJAK B., MOSER M., LEKEUX P., BUREAU F. Treatment of experimental asthma by decoy-mediated inhibition of Activator Protein-1. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2005b, **172**, 671-678.