

## Interactions entre glucocorticoïdes et peptides anti-inflammatoires

par Agnès Bellocq, Sophie Doublier, Julie Peltier, Sidonie Suberville, Bruno Fouqueray et Laurent Baud

INSERM U489 et Service d'Explorations Fonctionnelles Multidisciplinaires,  
Hôpital Tenon, 4, rue de la Chine, 75020 Paris  
E-mail : laurent.baud@tnn.ap-hop-paris.fr

Reçu le 16 juin 1999

### RÉSUMÉ

Les médiateurs pro- et anti-inflammatoires modulent l'activité anti-inflammatoire des glucocorticoïdes, en partie parce qu'ils modifient la liaison de ces stéroïdes à des récepteurs spécifiques. La somatostatine par exemple augmente la liaison des glucocorticoïdes et la réponse que celle-ci entraîne dans les macrophages. Les mécanismes de cette régulation n'impliquent pas une expression augmentée du récepteur

des glucocorticoïdes mais plutôt une stabilisation des *heat shock proteins 90* qui y sont associées. C'est une diminution de l'activité des calpaïnes qui en est responsable. C'est pourquoi l'inhibition pharmacologique des calpaïnes pourrait être une nouvelle stratégie pour augmenter l'efficacité anti-inflammatoire des glucocorticoïdes.

### SUMMARY Interactions between glucocorticoid and anti-inflammatory peptides

Both pro- and anti-inflammatory mediators regulate the anti-inflammatory actions of glucocorticoids, in part by modifying the binding of glucocorticoids to specific receptors. For instance, somatostatin has been shown to increase glucocorticoid binding and signaling in macrophages. The mechanism of this regulation does not require an increased expression of

glucocorticoid receptors but, rather, a stabilization of glucocorticoid receptor-associated *heat shock protein 90*. This is related to a decrease in calpain activity. Thus calpain inhibition may offer a new and exciting possibility for enhancing the anti-inflammatory efficiency of glucocorticoids.

### LES MÉDIATEURS DE L'INFLAMMATION CONTRÔLENT LA LIAISON DES GLUCOCORTICOÏDES À LEURS CELLULES CIBLES

La capacité des glucocorticoïdes d'interagir avec des tissus cibles et de provoquer une réponse, en particulier anti-inflammatoire, requiert la présence de récepteurs spécifiques (GR). Il existe même une corrélation directe entre l'expression de GR dans une cellule et la sensibilité de cette cellule aux glucocorticoïdes (Vanderbilt *et al.*, 1987). Or, cette expression est contrôlée, les mécanismes qui la modifient étant d'une grande diversité, transcriptionnels, post-transcriptionnels et post-traduc-

tionnels (Brönnegard, 1996). Les médiateurs de l'inflammation qui favorisent l'accumulation intracellulaire d'AMP cyclique, comme la prostaglandine E<sub>2</sub> ou la prostacycline, augmentent l'expression de GR par un contrôle post-transcriptionnel, c'est-à-dire par stabilisation des ARN messagers correspondants (Brönnegard, 1996 ; Dong *et al.*, 1989). Des cytokines pro-inflammatoires, dont le second messager intracellulaire n'est pas l'AMP cyclique comme l'interleukine-(IL-)1 $\beta$  et le *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF $\alpha$ ), augmentent le nombre de GR respectivement dans les cellules épithéliales bronchiques humaines (Verheggen *et al.*, 1996) et les cellules fibroblastiques murines (Costas *et al.*, 1996). L'affinité des récepteurs pour le ligand est diminuée dans le premier

cas et n'est pas modifiée dans le second. Comme l'IL-1 $\beta$ , l'IL-4 (lorsqu'elle est associée à l'IL-2) et l'IL-13, deux cytokines anti-inflammatoires, augmentent le nombre de GR dont elles diminuent l'affinité, respectivement dans les lymphocytes et les monocytes humains (Kam *et al.*, 1993; Spahn *et al.*, 1996).

La possibilité qu'un neuropeptide, la somatostatine, ait le même rôle régulateur que les cytokines a été examinée récemment par notre groupe (Baud *et al.*, 1997). Cette étude a été justifiée par l'observation que (1) la somatostatine est exprimée dans les foyers inflammatoires par exemple dans un modèle d'inflammation aseptique induite par l'administration sous-cutanée de carraghène (Karalis *et al.*, 1995), (2) les glucocorticoïdes augmentent cette expression (Karalis *et al.*, 1994) et (3) l'efficacité anti-inflammatoire des glucocorticoïdes est limitée dans ces modèles d'inflammation lorsque la disponibilité de la somatostatine est réduite par l'administration d'un anticorps neutralisant (Karalis *et al.*, 1995). Nous avons donc testé l'hypothèse que la somatostatine amplifie la réponse aux glucocorticoïdes en augmentant la liaison spécifique de ces stéroïdes aux cellules cibles (Baud *et al.*, 1977). Les résultats de l'étude ont montré que l'exposition de macrophages murins de la lignée RAW 264.7 à la somatostatine amplifie leur capacité de liaison de la dexaméthasone tritiée. Cette réponse est caractérisée par une dépendance vis-à-vis de la dose – la dose la plus efficace est de 10 nM –, et du temps – une augmentation d'un facteur 2 est atteinte après 12 heures environ. Elle est expliquée par une augmentation du nombre de sites GR dont l'affinité pour le ligand n'est pas significativement modifiée. Les mécanismes moléculaires impliqués sont en partie identifiés. La somatostatine ne modifie pas l'expression de GR telle qu'elle peut être mesurée par *Western blotting* ou par *RNAse protection assay*, mais elle stabilise la *heat shock protein* (Hsp)90, une molécule chaperonne associée à GR et indispensable pour que le ligand ait accès au domaine de liaison (Pratt & Toft, 1997). En effet, Hsp 90  $\beta$  (ou Hsp 84) est détectable par *Western blotting* en partie sous la forme d'une protéine intacte de ~90 kDa et en partie sous la forme d'un produit de dégradation de ~75 kDa. L'utilisation, dans ces expériences, de deux anticorps différents dirigés contre le domaine C- ou N-terminal de Hsp 90  $\beta$  a permis de démontrer que c'est le domaine C-terminal qui est spontanément tronqué dans les cellules de la lignée RAW 264.7. Cette dégradation est prévenue par la somatostatine dont l'efficacité est maximale à une concentration de 10 nM. La dégradation d'Hsp 90  $\beta$  est vraisemblablement due à sa protéolyse par des calpaïnes, et la protection apportée par la somatostatine implique le blocage de ces enzymes. En effet, (1) dans une étude antérieure, Minami et coll. (Minami *et al.*, 1994) ont montré que l'exposition de Hsp 90 purifiée à la m-calpaïne entraîne le clivage du domaine C-terminal de la molécule et donc la soustraction de 10 à 15 kDa. Cette protéolyse limitée empêche ensuite Hsp 90 de se dimériser et de se lier à GR. (2) Notre étude a montré que l'exposition des cellules de la lignée RAW 264.7 au N-acétyl-Leu-Leu-norleucinal, ou à la calpeptine, deux inhibiteurs pharmaco-

logiques des calpaïnes, amplifie leur capacité de lier la dexaméthasone tritiée. Lorsque les cellules sont exposées à la fois à la somatostatine et au N-acétyl-Leu-Leu-norleucinal, les réponses à chaque agent n'apparaissent pas additives, suggérant que la somatostatine agit en partie comme le N-acétyl-Leu-Leu-norleucinal, en limitant l'activité calpaïne. Enfin, (3) notre étude a montré que l'exposition des cellules de la lignée RAW 264.7 à la somatostatine limite leur activité calpaïne. Cette réponse est caractérisée par une dépendance vis-à-vis de la dose – la dose la plus efficace est de 10 nM –, et du temps – une diminution des 2/3 de l'activité enzymatique est atteinte après 2 heures environ.

Ce mécanisme n'explique pas la régulation apportée par tous les médiateurs pro- ou anti-inflammatoires. En particulier dans une étude préliminaire, nous avons observé que le *transforming growth factor*- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), une cytokine anti-inflammatoire puissante, augmente, comme la somatostatine, la liaison spécifique des glucocorticoïdes à des cellules mononucléées d'origine humaine. Mais dans ce cas, la réponse n'est pas associée à une limitation de l'activité calpaïne.

## LES MÉDIATEURS DE L'INFLAMMATION CONTRÔLENT LA RÉPONSE DE CELLULES CIBLES AUX GLUCOCORTICOÏDES

Il est très remarquable que des modifications relativement discrètes dans la liaison spécifique des glucocorticoïdes aux cellules cibles soient à l'origine de modifications importantes de la réponse de ces cellules aux glucocorticoïdes. Trois types de réponses au moins sont attendues. Après liaison de l'hormone, GR peut former un homodimère et interagir avec des séquences d'ADN spécifiques ou « *glucocorticoid-responsive elements* » (GRE) positifs dans les régions « *promoter* » ou « *enhancer* » de gènes pour en induire la transcription. Il peut aussi, sous cette forme de dimère, interagir avec des GRE négatifs pour, au contraire, bloquer la transcription. Il peut enfin, en l'absence de dimérisation, former dans le noyau des complexes moléculaires avec d'autres facteurs de transcription comme NF- $\kappa$ B ou AP-1 dont l'activité transactivatrice est alors bloquée. Ce dernier mécanisme, appelé « *interférence transcriptionnelle* », est le plus important, comme le montre l'efficacité persistante des glucocorticoïdes chez les souris GR<sup>dim/dim</sup> dont le gène GR a été muté de sorte que la dimérisation de GR et donc son interaction avec GRE sont impossibles (Karin, 1998).

Les médiateurs de l'inflammation qui favorisent l'accumulation intracellulaire d'AMP cyclique augmentent la liaison spécifique des glucocorticoïdes et ainsi la transcription de gènes sous le contrôle de ces hormones (Dong *et al.*, 1989). Au contraire, les cytokines anti-inflammatoires, IL-4 et IL-13, même si elles augmentent le nombre de sites GR, diminuent leur affinité pour le ligand. Elles limitent donc l'efficacité biologique des glucocorticoïdes (Kam *et al.*, 1993; Spahn *et al.*, 1996).

Le TNF- $\alpha$  pourrait modifier la réponse aux glucocorticoïdes indépendamment de ses effets sur l'expression de GR : il peut amplifier l'activité transcriptionnelle de GR en favorisant sa liaison à GRE (Costas *et al.*, 1996) ou au contraire limiter cette activité en activant la c-Jun N-terminal kinase (JNK) et en induisant ainsi la phosphorylation de GR (Rogatsky *et al.*, 1998). Enfin la somatostatine, en augmentant la liaison spécifique des glucocorticoïdes, amplifie à la fois l'activité transcriptionnelle de GR et l'interférence transcriptionnelle de GR avec NF- $\kappa$ B.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les médiateurs de l'inflammation, pro- et anti-inflammatoires, modulent l'efficacité anti-inflammatoire des glucocorticoïdes, en particulier en modifiant la disponibilité de récepteurs spécifiques. La démonstration que les calpaïnes cytosoliques limitent le nombre de récepteurs fonctionnels en provoquant le clivage des Hsp 90 qui y sont associées suggère une nouvelle voie thérapeutique. Elle implique de bloquer pharmacologiquement l'activité des calpaïnes pour amplifier l'efficacité anti-inflammatoire des glucocorticoïdes.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Baud L., Bellocq A., Perez J., Suberville S. & Fouqueray B., A novel action of somatostatin : induction of decreased affinity and transcriptional activity of glucocorticoid receptors. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1997, 8, 470 A.
2. Brönnegard M., Steroid receptor number. Individual variation and downregulation by treatment. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1996, 154, 528- S33.
3. Costas M., Trapp T., Pereda M. P., Sauer J., Rupprecht R., Nahmod V. E., Reul J. M. H. M., Hossboer F. & Arzt E., Molecular and functional evidence for *in vivo* cytokine enhancement of human and murine target cell sensitivity to glucocorticoids. TNF- $\alpha$  priming increases glucocorticoid inhibition of TNF- $\alpha$ -induced cytotoxicity/apoptosis. *J. Clin. Invest.*, 1996, 6, 1409-1416.
4. Dong Y., Aronsson M., Gustafsson J.-A. & Okret S., The mechanism of cAMP-induced glucocorticoid receptor expression. Correlation to cellular glucocorticoid response. *J. Biol. Chem.*, 1989, 264, 13679-13683.
5. Kam J. C., Szefer S. J., Surs W., Sher E. R. & Leung D. Y. M., Combination IL-2 and IL-4 reduces glucocorticoid receptor-binding affinity and T cell response to glucocorticoids. *J. Immunol.*, 1993, 151, 3460-3466.
6. Karalis K., Mastorakos G., Chrousos G. P. & Tolis G., Somatostatin analogues suppress the inflammatory reaction *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, 1994, 93, 2000- 2006.
7. Karalis K., Mastorakos G., Sano H., Wilder R. L. & Chrousos G.P., Somatostatin may participate in the anti-inflammatory actions of glucocorticoids. *Endocrinology*, 1995, 136, 4133-4138.
8. Karin M., New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor : is DNA binding dispensable? *Cell*, 1998, 93, 487-490.
9. Minami Y., Kimura Y., Kawasaki H., Suzuki K. & Yahara I., The carboxy-terminal region of mammalian Hsp 90 is required for its dimerization and function *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.* 1994, 14, 1459-1464.
10. Pratt W. B. & Toft D. O., Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr. Rev.*, 1997, 18, 306-360.
11. Rogatsky I., Logan S.K. & Garabedian M.J., Antagonism of glucocorticoid receptor transcriptional activation by the c-Jun N-terminal kinase. *Proc. Natl. Acad. sci. USA*, 1998, 95, 2050-2055.
12. Spahn J. D., Szefer S. J., Surs W., Doherty D. E., Nimmagadda S. R. & Leung D. Y. M., A novel action of IL-13. Induction of diminished monocyte glucocorticoid receptor-binding affinity. *J. Immunol.*, 1996, 157, 2654-2659.
13. Vanderbilt J. N., Miesfeld R., Maler B. A. & Yamamoto K. R., Intracellular receptor concentration limits glucocorticoid dependent enhancer activity. *Mol. Endocrinol.*, 1987, 1, 68-74.
14. Verheggen M. M., Van Hal P. T. W., Adriaansen-Soeting P. W. C., Goense B. J. A., Hoogsteden H. C., Brinkmann A. D. & Versnel M. A., Modulation of glucocorticoid receptor expression in human bronchial epithelial cell lines by IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and LPS. *Eur. Respir. J.*, 1996, 9, 2036-2043.