



Disponible en ligne sur
SciVerse ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com

REVUE FRANÇAISE
D'**Allergologie**

Revue française d'allergologie xxx (2013) xxx–xxx

Des composants des voies de signalisation calcique, potentielles cibles thérapeutiques dans l'asthme allergique

Calcium signaling components as potential therapeutic targets in allergic asthma

L. Pelletier^{*,1}, M. Savignac¹

Inserm U1043, CNRS U5282, centre de physiopathologie de Toulouse Purpan, CHU de Purpan, université Paul-Sabatier,
place du Dr-Baylac, 31024 Toulouse, France

Résumé

L'asthme allergique est une maladie inflammatoire pulmonaire chronique qui pourrait être initiée par des lymphocytes T auxiliaires (Th) de type 2 (Th2) producteurs d'interleukine (IL)-4, 5 et 13. Toutefois, d'autres populations de Th comme les Th17 et les Th9 pourraient participer à la pathologie dans certaines formes d'asthme. L'augmentation de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} ([Ca]_i) est nécessaire à la plupart des fonctions des lymphocytes. Toutefois la signature définie par l'amplitude, la fréquence et la localisation des variations de [Ca]_i n'est pas la même dans les sous-populations de lymphocytes ce qui peut interférer avec le type de gènes induits et les fonctions lymphocytaires. Nous avons identifié des canaux calciques comme sélectivement surexprimés dans les Th2 et dont l'inhibition abroge le développement d'asthmes expérimentaux sans immunosuppression globale. Nous discuterons des potentialités thérapeutiques qu'apporte l'identification d'une voie de signalisation propre aux Th2 et peut-être à d'autres cellules inflammatoires typiques de l'asthme.

© 2013 Publié par Elsevier Masson SAS.

Mots clés : Asthme ; Lymphocyte Th2 ; Signalisation calcique ; Signature calcique ; Canaux calciques Ca_v1 ; Oligonucléotides anti-sens

Abstract

Allergic asthma is a chronic pulmonary inflammatory disease, which is considered to be initiated by allergen-specific type 2 T helper (Th2) lymphocytes, cells which produce interleukins (IL) 4, 5 and 13. However, other Th cell subsets, such as Th17 and Th9 cells, might participate in the pathology of some forms of asthma. Increase in the concentration of intracellular Ca^{2+} ([Ca]_i) is required for most lymphocyte functions. Nevertheless, the calcium signature, as defined by the amplitude, the frequency of calcium oscillations and the localization of variations in [Ca]_i, is not the same in different T cell subsets, which may interfere with the type of genes induced and with some lymphocyte functions. We have identified calcium channels, which are selectively over-expressed in Th2-cells, and we have shown that their inhibition abolishes the development of experimental asthma without general immunosuppression. We will discuss possible therapeutic applications resulting from the identification of a signaling pathway specific to Th2-cells and perhaps to other types of inflammatory cells characteristic of asthma.

© 2013 Published by Elsevier Masson SAS.

Keywords: Asthma; Th2 lymphocytes; Calcium signaling; Calcium signature; Ca_v1 calcium channels; Antisense oligonucleotides

1. Introduction

Les maladies allergiques y compris l'asthme allergique sont des processus inflammatoires résultant d'une réponse inappropriée contre des allergènes qui n'induisent pas de réponse immunitaire ou même pour lesquels l'organisme génère normalement une tolérance. Les éosinophiles, les basophiles et certaines populations de lymphocytes T auxiliaires dites CD4⁺ ou helper (Th) sont des médiateurs importants de

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : lucette.pelletier@inserm.fr (L. Pelletier).

¹ Groupe européen de recherche (GDRE) « Ca^{2+} toolkit coded proteins as drug targets in animal and plant cells ».

l'inflammation allergique. Les lymphocytes T CD4⁺ effecteurs comprennent des sous-populations distinctes comme les Th1, les Th2, les Th17 et les Th9 [1]. Ces sous-populations diffèrent par l'expression de facteurs de transcription dits spécifiques de lignage, par leurs productions de cytokines et par leurs fonctions [1]. Les Th1 producteurs d'interféron-gamma sont impliqués dans l'élimination des virus mais peuvent causer des maladies auto-immunes. Les Th2 qui sécrètent de l'interleukine (IL)-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 (que nous qualifierons de cytokines Th2) participent à l'éradication des parasites mais il a été montré qu'ils peuvent initier des maladies allergiques à la fois dans des modèles expérimentaux mais aussi chez l'homme bien qu'ils ne soient pas la seule population de lymphocytes T impliqués [1,2]. Les Th9, qui produisent de l'IL-9 jouerait un rôle important dans l'asthme [3]. Les Th17 qui produisent de l'IL-17 et de l'IL-22 jouent normalement un rôle dans la lutte contre les pathogènes mais ils ont aussi été associés à des formes sévères d'asthme chez l'Homme [1]. Enfin, des populations de lymphocytes T régulateurs (Treg) sont capables de limiter les réponses immunitaires dépendant des Th1, Th2 et Th17. Il est admis qu'un défaut des Treg est impliqué dans le développement des maladies allergiques [4]. Deux composantes participent à la pathologie asthmatique : le système immunitaire (inné et adaptatif) et le tissu pulmonaire lui-même. Les cellules épithéliales agressées au cours de l'asthme allergique produisent des cytokines comme le TSLP, l'IL-33 et l'IL-25 qui vont agir sur des cellules immunitaires innées [5] favorisant la production de cytokines comme l'IL-5 et l'IL-13. De plus, elles vont orienter la réponse immunitaire vers une réponse Th2. Par la suite, la réaction inflammatoire entretiendra les lésions tissulaires qui elles-mêmes permettront de pérenniser l'inflammation [6]. Cette double-composante explique probablement pourquoi des gènes de susceptibilité à l'asthme mettent en cause les processus de réparation tissulaire et le système immunitaire. Environ 300 millions d'individus souffrent d'asthme dans le monde et les estimations portent ce nombre à 400–450 millions de gens dans le monde en 2025 (<http://www.efanet.org>). La chronicité de l'inflammation aboutit à une hypertrophie des muscles lisses, une hyperplasie des cellules caliciformes sécrétrices de mucus et à de la fibrose en particulier chez les patients dont la maladie est mal contrôlée. Ces changements peuvent alors évoluer vers un rétrécissement irréversible des voies aériennes. Dix à 20 % des asthmatiques souffrent d'un asthme sévère mal contrôlé ; ils peuvent avoir un nombre élevé de polynucléaires neutrophiles, un nombre augmenté de Th1/Th17, avec un tableau se rapprochant de la bronchopneumopathie obstructive (COPD, une maladie chronique des voies aériennes de petit calibre responsable d'une perte irréversible des fonctions pulmonaires) [7]. Souvent l'asthme débute dans l'enfance et il paraît logique d'essayer d'interrompre le cercle vicieux de l'inflammation, le plus tôt possible. Les traitements sont le plus souvent symptomatiques faisant appel aux agonistes des récepteurs bêta-adrénergiques associés ou non aux corticoïdes. Seule la désensibilisation à l'allergène qui semble induire des Treg spécifiques peut guérir la maladie [8]. Néanmoins, cette procédure reste de pratique limitée et ne réussit pas

systématiquement. Puisque la pathologie fait intervenir les cytokines Th2 en particulier l'IL-13, il était tentant de proposer des anticorps/inhibiteurs de ces cytokines mais ces travaux en cours d'évaluation n'ont pas donné les résultats escomptés. Il nous a paru intéressant d'essayer de trouver des cibles bloquant les fonctions Th2 et peut-être d'autres cellules pathogènes afin de proposer des traitements, tôt dans la maladie.

2. Signalisation calcique comme une cible potentielle dans le traitement de l'allergie

Le Ca²⁺ est un second messager universel important pour la plupart des fonctions cellulaires dont la transcription de gènes. Sa concentration intracellulaire ([Ca]_i) est étroitement régulée et met en jeu des canaux, des pompes... présents à la membrane cellulaire et à celle d'organelles intracellulaires comme le réticulum endoplasmique. Il peut paraître surprenant de proposer des composants de la signalisation calcique comme des cibles thérapeutiques dans l'allergie. Pourtant le concept de signature calcique, défini par les amplitudes de variations de [Ca]_i variations, l'allure de ces variations (fréquence d'oscillations, plateau, durée...) influence la nature des gènes exprimés [9]. Le fait que cette signature calcique diffère entre lymphocytes T effecteurs (Th1-Th2-Th17) suggère que les composants régulant la signature calcique peuvent caractériser chaque type de lymphocytes T. Ainsi la [Ca]_i basale est la plus basse dans les Th1, la plus haute dans les Th2 et intermédiaire dans les Th17. En revanche, l'augmentation de [Ca]_i après activation via le récepteur T pour l'antigène (TCR) est la plus élevée dans les Th1, intermédiaire dans les Th17 et la moins importante et soutenue dans les Th2, avec comme conséquence probable une activation différentielle de facteurs de transcription dans ces types de lymphocytes T [10] (Fig. 1).

Classiquement, il est admis que la stimulation via le TCR recrute et active la phospholipase C gamma qui clive le phosphatidyl inositol biphosphate en inositol triphosphate (IP3) et diacylglycérol. L'IP3 se fixe sur des récepteurs (RIP3) à la membrane du RE. Les RIP3 sont des canaux calciques qui s'ouvrent et font passer le Ca²⁺ du RE dans le cytoplasme (Fig. 1). La baisse de concentration de Ca²⁺ dans le RE est perçue par les molécules STIM à la surface du RE causant leur relocalisation vers la membrane cellulaire où ils permettent l'ouverture de canaux calciques Orai permettant un influx de Ca²⁺ dans la cellule à partir du milieu extracellulaire. Cet influx est nécessaire pour restaurer les stocks intracellulaires de Ca²⁺ et pour permettre l'activation optimale des lymphocytes. L'augmentation de [Ca]_i active entre autres la calcineurine, une phosphatase qui déphosphoryle le facteur de transcription NFAT, permettant sa localisation dans le noyau où il se lie, seul ou avec d'autres facteurs de transcription, sur des séquences cibles sur l'ADN contrôlant l'expression de nombreux gènes dont ceux codant les cytokines. L'importance de la voie calcique est capitale, puisque plus de 75 % des gènes dont l'expression est modifiée par stimulation via le TCR dépendent du Ca²⁺ [11]. De plus, certains patients dont le gène codant Orai1 est muté, avec une perte d'expression de la protéine, souffrent d'immunodéficience sévère [12]. Il est néanmoins

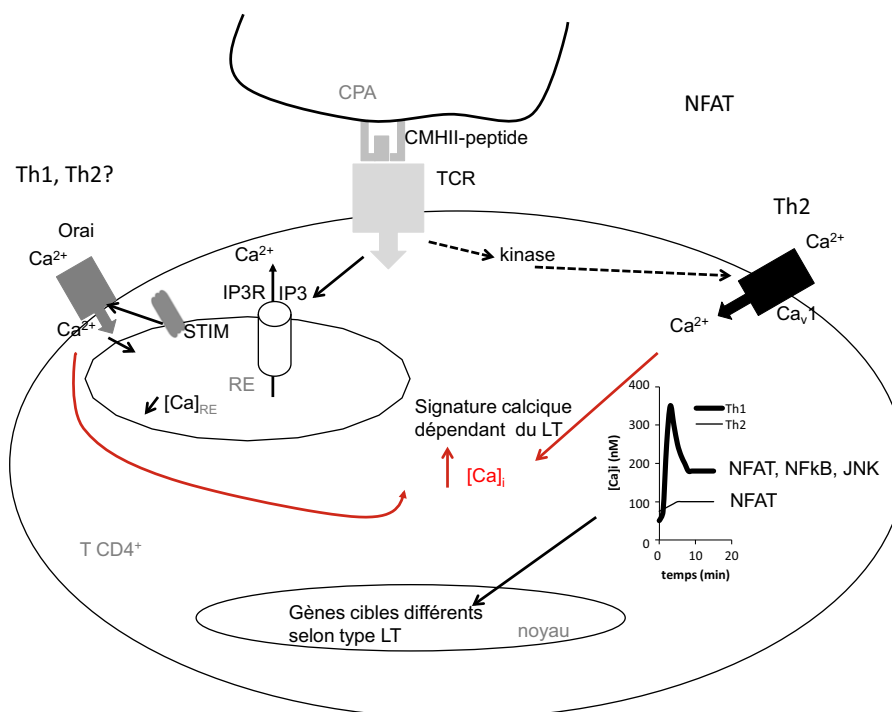


Fig. 1. Hypothèse rendant compte de la signalisation calcique différentielle dans les lymphocytes T. La stimulation via le TCR induit classiquement l'activation de la phospholipase C γ , la formation d'IP3 qui se fixe à ses récepteurs (RIP3) sur la membrane du réticulum (RE). Les RIP3 libèrent le Ca^{2+} du RE dans le cytosol. La diminution de la concentration de Ca^{2+} dans le RE est perçue par les molécules STIM qui se mettent en apposition avec les canaux calciques Orai à la membrane plasmique. Ceux-ci s'ouvrent permettant une entrée soutenue de Ca^{2+} dans la cellule. Cette voie prédominerait dans les Th1 et pourrait être associée avec l'allure du signal décrite par la courbe (Th1) et l'activation optimale des facteurs de transcription NFAT, NFkB... Dans les Th2, selon notre hypothèse, le récepteur T pour l'antigène (TCR) serait couplé à une entrée de Ca^{2+} dépendant des canaux Ca_v1 et serait associé à une réponse calcique soutenue mais de plus faible amplitude que pour les Th1. Cela pourrait avoir pour conséquence un profil d'activation de facteurs de transcription différents de celui observé dans les Th1 avec un retentissement sur le type de gènes activés. Les courbes de réponses calciques ne sont qu'illustratives et ne découlent pas de données expérimentales.

certain que d'autres canaux calciques sont importants pour la fonction des lymphocytes. Notre groupe a identifié les canaux dépendant du voltage (Ca_v1) normalement trouvés dans les cellules excitables (neurones, cellules musculaires, cœur) comme étant sélectivement surexprimés dans les Th2 [13]. Notre but est maintenant d'identifier comment ces canaux contribuent à la signalisation calcique dans les Th2, de définir les composants des voies de signalisation impliquées dans l'entrée de Ca^{2+} via les canaux Ca_v1 dans les Th2, de montrer s'ils sont sélectifs des Th2 et autres sous-populations de lymphocytes T impliqués dans l'asthme. Ultimement, notre but est d'identifier des cibles thérapeutiques les plus sélectives des cellules immunitaires pathogènes en évitant au mieux des effets adverses et une immunosuppression globale. Nous testerons ensuite l'effet de l'inhibition de ces cibles dans des modèles expérimentaux d'asthme, puis nous validerons nos résultats en utilisant des lymphocytes humains.

3. Rôle d'une voie de signalisation calcique sélective des lymphocytes Th2 dans leurs fonctions : application thérapeutique

Le rôle des canaux Ca_v1 est bien documenté dans les cellules excitables mais il existe un nombre grandissant de travaux montrant l'importance de ces canaux dans les cellules non excitables, y compris dans les lymphocytes [14,15]. Les canaux

Ca_v1 sont formés par la sous-unité $\alpha1$ qui forme le pore calcique et est codée par quatre gènes (de $\text{Ca}_v1.1$ à $\text{Ca}_v1.4$) et des sous-unités auxiliaires. $\text{Ca}_v1.1$ est présent dans les muscles squelettiques. $\text{Ca}_v1.2$ et $\text{Ca}_v1.3$ sont fréquemment trouvés dans les mêmes tissus, même si leurs rôles ne sont pas redondants comme en attestent les phénotypes différents des souris dont les gènes codant $\text{Ca}_v1.2$ ou $\text{Ca}_v1.3$ sont invalidés [16]. $\text{Ca}_v1.4$ est la forme rétinienne. Les sous-unités auxiliaires $\text{Ca}_v\beta$ et $\text{Ca}_v\alpha2\delta$ sont importantes pour un trafic correct du canal à membrane cellulaire et à la régulation du canal. Quatre gènes codent chacune de ses sous-unités, avec de multiples variants, ce qui enrichit la diversité des canaux pouvant être exprimés par les cellules. Nous avons montré que les Th2 sur-expriment sélectivement des canaux $\text{Ca}_v1.2$ et $\text{Ca}_v1.3$ et que la diminution d'expression de ces canaux obtenue par transfection de Th2 avec des oligodeoxynucléotides anti-sens spécifiques (Ca_v1AS) est responsable d'une réponse calcique altérée et d'une incapacité à produire des cytokines. Qui plus est, des Th2 spécifiques de l'ovalbumine (OVA) et transfectés avec les Ca_v1AS injectés chez des souris BALB/c à qui on administre l'OVA par voie intranasale sont capables de gagner les poumons et les ganglions médiastinaux mais ils ont perdu leur capacité à induire une inflammation typique de l'asthme [13]. Cela démontre le rôle de ces canaux dans les fonctions effectrices Th2. De façon intéressante, l'injection de Th1 spécifiques de l'ovalbumine, transfectés ou non avec les

Ca_v1 AS et injectés chez des souris BALB/c à qui on administre l'OVA par voie intranasale provoque une inflammation pulmonaire similaire marquée par la prédominance de neutrophiles [13]. Cela démontre que chez la souris, l'inhibition des canaux Ca_v1 a un effet sélectif sur la fonction des Th2 sans modifier celle des Th1. Nous avons par ailleurs montré qu'il est possible d'utiliser avec profit les Ca_v1AS dans un modèle d'asthme actif [13]. En effet, l'immunisation de souris BALB/c avec de l'OVA en alun, un adjuvant qui favorise le développement de Th2, suivi par l'inhalation d'OVA cause une inflammation de type asthmatique. L'inhalation simultanée d'OVA et de Ca_v1AS prévient remarquablement l'inflammation et l'hyperréactivité bronchique [13].

L'étape suivante est de démontrer que les Th2 humains comme ceux de souris expriment les canaux Ca_v1. Nos données récentes montrent que tel est le cas et que le profil d'expression de ces canaux est hautement plastique dépendant à la fois de l'état d'activation et de différenciation des lymphocytes T. Ces données nous ont conduit à démarrer un projet de recherche clinique afin de déterminer si les lymphocytes T de sujets asthmatiques et les cellules inflammatoires présentes dans le poumon de sujets asthmatiques sur-expriment les canaux Ca_v1. Nous pensons que la stimulation chronique des Th2 de patients allergiques pourrait être responsable d'une expression majorée des canaux Ca_v1, en comparaison de Th2 isolés à partir de sujets non allergiques. Un autre de nos axes de recherche est de comprendre comment ces canaux peuvent être régulés afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Notre hypothèse actuelle est que l'ouverture des canaux Ca_v1 est régulée par des kinases dont l'identification permettra de tester si leur inhibition a des effets bénéfiques sur le développement de l'asthme.

La meilleure compréhension d'une voie de signalisation requise pour la production de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13 qui sont toutes délétères dans l'asthme et l'identification de composants sélectifs des lymphocytes contribuant à la pathologie peut apporter de nouvelles pistes thérapeutiques. L'inhalation d'oligonucléotides anti-sens modifiés ou non pour augmenter leur stabilité n'apparaît pas comme une idée farfelue [17] d'autant que, vue la grande diversité des séquences des sous-unités des canaux Ca_v1, on peut s'attacher à screener des anti-sens efficaces, d'une vingtaine de nucléotides, complémentaires des ARNs ciblés.

Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

Remerciements

Les auteurs remercient l'Association « 111 des Arts » et la Société française d'allergologie pour le soutien apporté à leur recherche. Un projet collaboratif Inserm direction générale de l'organisation des soins (DGOS) soutient le projet de recherche clinique.

Références

- [1] Akdis M, Palomares O, van de Veen W, van Splunter M, Akdis CA. TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129: 1438–49.
- [2] Lloyd CM, Hessel EM. Functions of T cells in asthma: more than just T(H)2 cells. *Nat Rev Immunol* 2010;10:838–48.
- [3] Jabeen R, Kaplan MH. The symphony of the ninth: the development and function of Th9 cells. *Curr Opin Immunol* 2012;24:303–7.
- [4] Lloyd CM, Hawrylowicz CM. Regulatory T cells in asthma. *Immunity* 2009;31:438–49.
- [5] Kaiko GE, Foster PS. New insights into the generation of Th2 immunity and potential therapeutic targets for the treatment of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011;11:39–45.
- [6] Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest* 2008;118:3546–56.
- [7] Barnes PJ. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat Rev Immunol* 2008;8:183–92.
- [8] Viswanathan RK, Busse WW. Allergen immunotherapy in allergic respiratory diseases: from mechanisms to meta-analyses. *Chest* 2012;141: 1303–14.
- [9] Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000;1:11–21.
- [10] Dolmetsch RE, Lewis RS, Goodnow CC, Healy JI. Differential activation of transcription factors induced by Ca²⁺ response amplitude and duration. *Nature* 1997;386:855–8.
- [11] Feske S, Giltman J, Dolmetsch R, Staudt LM, Rao A. Gene regulation mediated by calcium signals in T-lymphocytes. *Nat Immunol* 2001;2: 316–24.
- [12] Feske S, Skolnik EY, Prakriya M. Ion channels and transporters in lymphocyte function and immunity. *Nat Rev Immunol* 2012;12:532–47.
- [13] Djata Cabral M, Paulet PE, Robert V, Gomes B, Renoud ML, Savignac M, et al. Knocking-down Ca_v1 calcium channels implicated in Th2-cell activation prevents experimental asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:1310–7.
- [14] Robert V, Triffaux E, Savignac M, Pelletier L. Calcium signalling in T-lymphocytes. *Biochimie* 2011;93:2087–94.
- [15] Robert V, Triffaux E, Savignac M, Pelletier L. Singularities of calcium signaling in effector T-lymphocytes. *Biochimica Biophysica Acta* 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamer.2012.12.001> [pii: S0167-4889(12)00364-3, Epub ahead of print].
- [16] Moosmang S, Lenhardt P, Haider N, Hofmann F, Wegener JW. Mouse models to study L-type calcium channel function. *Pharmacol Ther* 2005;106:347–55.
- [17] Popescu FD. Antisense- and RNA interference-based therapeutic strategies in allergy. *J Cell Mol Med* 2005;9:840–53.