



Faculté de pharmacie



UNIVERSITÉ DE  
SHERBROOKE

Faculté de médecine  
et des sciences de la santé

UMR-CNRS 7213 laboratoire de Biophotonique et de pharmacologie,  
Université de Strasbourg

Département de Physiologie et Biophysique,  
Université de Sherbrooke

**Rôle de la phosphodiesterase spécifique de l'AMPC (PDE4) dans deux modèles  
d'inflammation chronique : le lupus érythémateux disséminé et l'asthme.**

Thèse présentée à Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé de Strasbourg  
en vue de l'obtention du grade de docteur es science en pharmacologie moléculaire,

et à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du grade  
de Philosophiae Doctor (Ph.D.) en Physiologie

Par YOUGBARE Issaka

20 Décembre 2010

**Composition du Jury :**

**Présidente du Jury :**

Pr Valérie SCHINI-KERTH, Université de Strasbourg, France

**Rapporteurs externes :**

Pr Jean- Pierre SAVINEAU, Université Victor Ségalen Bordeaux 2, France

Pr Manuel-Campos TOIMIL, Universidade de Santiago de Compostela, Espagne

**Co-directeurs de thèses :**

Dr Claire LUGNIER, co-directeur de thèse, Université de Strasbourg, France

Pr Eric ROUSSEAU, Co-directeur de thèse, Université de Sherbrooke, Canada

## SOMMAIRE

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	5
<b>Listes des Manuscrits pour publications</b> .....	6
<b>Listes des Communications à des congrès internationaux</b> .....	6
<b>Liste des abréviations</b> .....	7
<b>Préambule</b> .....	10
<b>I) INTRODUCTION</b> .....	13
I.1. La superfamille des phosphodiesterases des nucléotides cycliques.....	13
I.1.1 Les nucléotides cycliques .....	13
I.1.1.1 L'AMPc et ces cibles intracellulaires .....	15
I.1.1.1.1 La protéine kinase A dépendante de l'AMPc .....	16
I.1.1.1.2 Les « Exchange Proteins Activated by cAMP ».....	18
I.1.1.1.3 Les canaux ioniques régulés par les nucléotides cycliques.....	19
I.1.1.2 Le GMPc et ses cibles cellulaires .....	20
I.1.1.2.1 Les Protéines kinases G .....	22
I.1.1.2.2 Les effets de la PKA et PKG sur la relaxation du muscle lisse .....	23
I.1.2 Les phosphodiesterases des nucléotides cycliques .....	24
I.1.2.1 Structures comparatives et nomenclature des PDEs.....	25
I.1.2.2 Les différentes familles de PDEs et leurs rôles physiologiques. ....	29
I.1.2.2.1 La famille des phosphodiesterases de type 1 (PDE1) .....	29
I.1.2.2.2 La famille des phosphodiesterases de types 2 (PDE2): .....	32
I.1.2.2.3 La famille des PDE3: .....	33
I.1.2.2.4 La famille des PDE4 .....	34
I.1.2.2.4.1 Structure et activités hydrolytiques des PDE4s .....	34
I.1.2.2.4.2 Compartimentalisation l'AMPc et interactome des PDE4s .....	35
I.1.2.2.4.3 Inhibition des PDE4s et leurs régulations à court et long terme.....	37
I.1.2.2.4.4 Les inhibiteurs de PDE4s en cours de développement .....	39
I.1.2.2.5 Les familles de PDE5.....	41
I.1.2.2.6 Les familles de PDE6 à PDE11 .....	41
I.2 Généralités sur l'inflammation chronique.....	42
I.2.1 Revue de la littérature sur 2 modèles d'inflammations chroniques .....	45
I.2.1.1 Le lupus érythémateux disséminé (LED) .....	45
I.2.1.1.1 Manifestations cliniques du LED.....	45
I.2.1.1.2 Physiopathologie du lupus .....	46
I.2.1.2 Anatomie fonctionnelle et physiologie du système urinaire.....	50
I.2.1.3 Les atteintes rénales au cours du lupus : .....	52
I.2.1.4 Collaboration scientifique entre l'équipe de C. LUGNIER et E. ROUSSEAU.....	54
I.2.2 L'asthme .....	55
I.2.2.1 Anatomie fonctionnelle de l'appareil respiratoire .....	55
I.2.2.2 Les maladies inflammatoires chroniques des systèmes respiratoires : asthme, la ....	58

I.3	Justification de la problématique de recherche .....	61
I.4	But et objectifs de recherche .....	64
I.4.1	Objectifs spécifiques dans le cas du lupus .....	64
I.4.2	Objectifs spécifiques dans le cas de l'asthme .....	64
<b>II)</b>	<b>MATERIEL AND METHODES .....</b>	<b>65</b>
II.1	Animaux et traitements .....	65
II.2	Préparation des extraits tissulaires (protéines) et des ARN totaux .....	66
II.3	Dosages radio-enzymatiques des activités PDEs .....	66
II.4	Techniques de Western blot .....	68
II.5	Techniques Real-Time PCR .....	69
II.6	Techniques d'immuno-histochimie .....	70
II.7	Fractionnement subcellulaire du parenchyme .....	71
II.8	Protocole de test de prolifération de cellules A549 .....	71
II.9	Cultures cellulaires et cultures organoïdes des tissus pulmonaires .....	72
II.10	Cultures organoïdes des tissus pulmonaires .....	74
II.11	Mesures de tension mécanique en bain d'organe isolé.....	74
<b>III)</b>	<b>RESULTATS .....</b>	<b>77</b>
III.1	Manuscrit 1: Disease progression in MRL/lpr lupus-prone mice is reduced by a specific PDE4 inhibitor .....	77
III.2	Manuscrit 2 : Effect of NCS 613, a specific PDE4 inhibitor, on cAMP, PDE4s regulations and on immune complexes in kidney from MRL/lpr lupus- prone mice. ....	100
III.3	Manuscrit: Cyclic GMP catabolism up-regulation in MRL/lpr lupus prone mice is associated to organ remodeling. ....	129
III.4	Manuscrit 4 : NCS 613, a potent and specific PDE4 inhibitor, displays anti-inflammatory effects on human lung tissues (soumis AJP). ....	154
III.5	Résultats complémentaires de manuscrit .....	182
III.5.1	Effets anti-inflammatoires du NCS 613 sur les PBMC.....	183
III.5.2	Effets antiprolifératifs du NCS 613 sur les cellules d'adénocarcinome A549.....	185
III.5.3	Effets anti-inflammatoires du NCS 613 sur les cellules A549 et les explants d'adénocarcinome pulmonaire humaine. ....	188
III. 5.4	Bilan des résultats complémentaires .....	189
<b>IV.</b>	<b>DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>190</b>
IV.1	Implication des PDE4 dans l'inflammation chronique.....	190
IV.2.	Effets biologiques du traitement par le NCS 613: .....	193
IV.2.1	Effets biologiques du NCS 613 au niveau systémique dans les PBMC. ....	193
IV.2.2	Effets biologiques du NCS 613 au niveau tissulaire.....	194
IV.3	Régulation des PDE4 suite à l'inhibition chronique par le NCS 613 .....	196
IV.4.	Voies de signalisations potentiellement régulées par NCS 613.....	197
<b>V.</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>199</b>
<b>VI.</b>	<b>PERSPECTIVES .....</b>	<b>200</b>
<b>ANNEXE :</b>	<b>Formulaire de consentement pour le patient lupique .....</b>	<b>221</b>

## LISTE DES FIGURES

## Pages

Figure 1 : Métabolisme des nucléotides cycliques par les phosphodiesterases .....	13
Figure 2 : représentation de la structure chimique des trois nucléotides cycliques .....	14
Figure 3. Localisation subcellulaire des AC .....	15
Figure 4. La voie de transduction du signal du GMPc .....	21
Figure 5. Mécanismes moléculaires de la relaxation des muscles lisses vasculaires .....	23
Figure 6: Les cibles moléculaires de la PKA et de la PKG au cours de la relaxation .....	24
Figure 7: Hydrolyse des nucléotides cycliques par les PDEs. ....	29
Figure 8. L'intéactome des PDE4s. ....	37
Figure 9. La signalisation par le complexe TCR/BCR dans les lymphocytes normaux. ....	49
Figure 10. Différences quantitatives dans la cascade de signalisation régulée par le TCR ou le BCR entre des lymphocytes normaux et lupiques. ....	49
Figure 11. Apparence macroscopique d'un rein de patient atteint du LED in SLE.....	53
Figure 12: Structures de glomérules de patient lupique. ....	54
Figure 13 : Inflammation chronique allergique et remodelage tissulaire dans l'asthme.....	60
Figure 14 : Principe du dosage radioenzymatique.. ....	67
Figure 15 : Illustration d'un gel d'intégrité des ARN totaux.....	70
Figure 16 Isolement et mise en culture de PBMC de patients lupiques et de sujets sains. ....	73
Figure 17 : Mesure de tension mécanique.....	75
Figure 18. Le protocole de mesure de tension mécanique par la technique de bain d'organe isolé. ....	76
Figure 19. Objectifs du projet lupus humains et NCS 613.....	182
Figure 20: Variation de l'expression de la PDE4B dans les PBMC de patients lupiques stimulées au LPS .....	183
Figure 21. Détections de la phospho-p38 MAPK et d'I $\kappa$ B $\alpha$ par Western Blot puis de la NF $\kappa$ B par immunocytochimie dans les PBMC humains stimulées ou non au LPS. ....	184
Figure 22: Expression de la PDE4C par immuno-cytochimie .....	185
Figure 23: Effets antiprolifératifs du NCS 613 sur les cellules A549.....	186
Figure 24: Inhibition par le NCS 613 de la phosphorylation de ERK 1/2 par Western blot... ..	187
Figure 25: Expression de la PDE4B et inhibition de l'activation de NF $\kappa$ B dans les cellules A549 traitées au TNF $\alpha$ . ....	188
Figure 26: Détection d'I $\kappa$ B $\alpha$ dans les explants d'adénocarcinomes pulmonaires humains ..	189
Figure 27. Les effets biologiques du NCS 613 sur différentes cibles moléculaires dans différents tissus et cellules.....	195

## **LISTE DES TABLEAUX**

	<b>Pages</b>
Tableau 1: Classification des PDE .....	27
Tableau 2: Affinités des différentes isoformes de PDE1 pour leurs substrats. ....	30
Tableau 3: Distribution tissulaire et subcellulaire des PDE1 chez les mammifères .....	31
Tableau 4: IC <sub>50</sub> des inhibiteurs de PDE2 .....	32
Tableau 5: Localisation subcellulaire des PDE3s. ....	34
Tableau 6 : Les inhibiteurs de PDEs dans le traitement de maladies autoimmunes. ....	40
Tableau 7: Broncho-constricteurs et bronchodilatateurs des muscles lisses respiratoires et leurs récepteurs associés.....	58

## **LISTE DES SCHEMAS**

Schéma 1 : Les signalosomes dans la signalisation intracellulaire par l'AMPc.. ....	20
Schéma 2 : Structure comparative de PDE (D'après (Lugnier, 2006). ....	26
Schéma 3 : Structure des 11 familles de PDE (Lugnier, 2006).....	28
Schéma 4: Structure des différentes isoformes de PDE4. ....	35
Schéma 5: Activation de la voie p38 MAPK.. ....	39
Schéma 6: La physiopathologie des anticorps anti-phospholipides.....	47
Schéma 7: Schéma du néphron.. ....	52
Schéma 8: Voie aérienne de conduction et zone respiratoire du système respiratoire.....	57

## REMERCIEMENTS

Ce présent mémoire est la résultante de tant d'efforts consentis par plusieurs personnes et structures. J'attache en conséquence du prix à ces quelques lignes à travers lesquelles je tiens à leurs exprimer toute ma profonde reconnaissance.

Je voudrais de façon toute particulière exprimer mes remerciements les plus sincères au Docteur Claire LUGNIER et au Professeur Eric ROUSSEAU pour m'avoir accueilli dans leurs équipes respectives et d'avoir accepté de diriger mes travaux. Je tiens à souligner leur longue et fructueuse collaboration qui m'a permise de réaliser cette thèse en cotutelle. Vos qualités humaines et scientifiques sont hautement appréciables.

J'exprime ma reconnaissance aux Professeurs Jean- Pierre SAVINEAU, Manuel-Campos TOIMIL et Valérie SCHINI-KERTH, d'avoir spontanément accepté de me faire l'honneur de juger mon travail, malgré leurs multiples occupations.

Je remercie le Professeur Yves MELY directeur de l'UMR-CNRS 7213, pour m'avoir accueilli au sein de son unité de recherches (Laboratoire de Biophotonique et de pharmacologie).

Je voudrais remercier également le programme de physiologie à travers son directeur le Professeur Louis GENDRON, ainsi que le Professeur Eric ROUSSEAU, Directeur du Département de Physiologie et Biophysique de l'Université de Sherbrooke pour m'avoir accordé l'opportunité de bénéficier de cette formation de PhD en cotutelle.

Je remercie le Dr Thérèse KERAVIS ainsi que l'équipe du Pr Sylviane MULLER à l'UPR CNRS 9021, Laboratoire d'immunologie et chimie thérapeutique, IBMC pour l'encadrement et la collaboration scientifique qui a permis de réaliser une partie de ces travaux.

A mes collègues doctorants et docteurs Mr Lazare BELEMNABA, Dr Abdurazzag ABUSNINA, Dr Walid MOKNI, Dr Erika COSSET, Dr Caroline MORIN, Mr Yannick SENOUVO, Mr Yacine TABET et Mlle Stéphanie CORRIVEAU merci pour votre soutien moral et au plaisir de vous voir soutenir bientôt. Merci également à Mme Héléne JUSTINIANO.

Je voudrais renouveler ma très profonde reconnaissance à ma femme Monique pour son soutien inconditionnel, à mes amis en particulier les familles Egrot et Gnada, mes parents et camarades qui n'ont cessé de me soutenir sur tous les plans. Qu'ils en soient remerciés.

Je voudrais remercier le Collège Doctoral Européen et le Centre de Recherche Clinique Etienne LEBEL du CHUS pour l'octroi des bourses qui m'ont permis de réaliser cette cotutelle.

Je ne saurais terminer sans remercier tout le personnel de l'UMR 7213 et en particulier Mme Marlyse VERNERT, Mme Ingrid BARTHEL pour leur aide considérable. Il me plaît également de remercier les professeurs et étudiants du Département de physiologie et de biophysique de l'Université de Sherbrooke pour les enseignements et les séminaires hebdomadaires qui m'ont permis d'enrichir mes connaissances scientifiques.

## LISTES DES MANUSCRITS POUR PUBLICATIONS:

- 1) **YOUNGBARE Issaka**, KERAVIS Thérèse, ABUSNINA Abdurraza, MONNEAUX Fanny, DECOSSAS Marion, MULLER Sylviane and LUGNIER Claire. Cyclic GMP catabolism up-regulation in MRL/lpr lupus-prone mice tissues is associated to organ remodeling.
- 2) **YOUNGBARE Issaka**, MONNEAUX Fanny, KERAVIS Thérèse, MULLER Sylviane and LUGNIER Claire . Effect of NCS613, a specific PDE4 inhibitor, on cAMP, PDE4s regulation and immune complexes in MRL/lpr lupus- prone mice (en preparation).
- 3) **YOUNGBARE I.**, MORIN C., SENOUVO F.Y., KERAVIS T., LUGNIER C., and É. ROUSSEAU. NCS 613, a potent and specific PDE4 inhibitor, displays anti-inflammatory in human lung tissues. Am. J. Physiol. (Lung) **en révision dans AJP**.
- 4) **YOUNGBARE I.**, BOIRE G., ROY M., KERAVIS T., LUGNIER C., and É. ROUSSEAU. NCS 613 exhibits anti-inflammatory effects in lupus patients PBMC by inhibiting of p38 MAPK and NF $\kappa$ B pathway and proinflammatory cytokine production. **En préparation pour le journal Lupus**.
- 5) **YOUNGBARE I.**, MORIN C., ABUSNINA A., BELEMNABA L., SENOUVO F.Y., KERAVIS T., LUGNIER C., and ROUSSEAU E. NCS 613, a potent and specific PDE4 inhibitor, displays anti-inflammatory and anti-proliferative properties on human adenocarcinoma explants and A549 cell line. **En préparation pour European Cancer Journal**.
- 6) MONNEAUX Fanny\*, KERAVIS Thérèse\*, **YOUNGBARE Issaka**, GAZI Lucien, BOURGUIGNON Jean-Jacques, MULLER Sylviane, and LUGNIER Claire. Disease progression in MRL/lpr lupus-prone mice is reduced by a specific PDE4 inhibitor. **Soumis à Journal of clinical investigation**.

## LISTES DES COMMUNICATIONS A DES CONGRES INTERNATIONAUX:

- I. Yougbare**, T. Keravis, C. Morin, C. Lugnier, É. Rousseau. Rôles des phosphodiesterases des nucléotides cycliques et conséquences de leur inhibition dans un modèle d'inflammation pulmonaire in vitro. 51<sup>e</sup> Réunion annuelle du CRCQ, 24-26 septembre 2009, Manoir du Lac Delage, Lac Delage, Qc, Canada.
- I. Yougbare**, T. Keravis, C. Morin, C. Lugnier, É. Rousseau. Détection et localisation des phosphodiesterases des nucléotides cycliques de type 4 (PDE4) dans le parenchyme pulmonaire humain en conditions normale et pro-inflammatoire. Congrès J2R Journée de Recherches Respiratoires, 29 octobre 2009, Strasbourg, France.
- I. Yougbare**, Morin C., Senouvo F.Y., Keravis T., Lugnier C., and Rousseau E. NCS 613, a potent and specific PDE4 inhibitor, displays anti-inflammatory and anti-proliferative properties in human lung tissues. Gordon Conference on Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase, 8-13th June 2010, Waterville Valley New Hampshire USA.
- I. Yougbare.** Morin C., Senouvo F.Y., Keravis T., Lugnier C., and Rousseau E. Effets anti-inflammatoires et anti-prolifératifs du NCS 613, un inhibiteur spécifique de phosphodiesterase 4 (PDE4). 52<sup>e</sup> Réunion annuelle du CRCQ, 23-24 septembre 2010, Château Bromont, Bromont, Qc, Canada.
- I. Yougbare.** Morin C., Lugnier C., and Rousseau E. Un inhibiteur spécifique de phosphodiesterase 4, le NCS 613 réduit l'inflammation pulmonaire et l'hyperréactivité bronchique déclenchées *in vitro* sur les tissus humains. APPQ-RSR, 18 au 20 novembre 2010, Montréal, QC Canada



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AP1: Facteur de transcription « Activator Protein 1 »

5-HT: Hydroxytryptamine  $\leftrightarrow$  Sérotonine

A549: Lignée de cellules cancéreuse épidermoïdes

AA: Acide Arachidonique

AC : Adénylyl-cyclase

ADNc: ADN complémentaire

AKAP : A-kinase anchoring protein

Akt/PKB : Protéine kinase B

AMP : Adénosine 5'-monophosphate

AMPc : Adénosine 3', 5'- monophosphate cyclique

AMPK : AMP5 prime'- kinase

ANP : Peptide natriurétique atrial

AP : Acide phosphatidique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ARN totaux: ARN total

ATF-1 : Activating transcription factor-1

ATP : Adénosine triphosphate

BNP : Peptide natriurétique Brain

BCR: "B cell receptor"

CaM : Calmoduline

CCRC: Cumulative Concentration Response Curve

CNG : "Cyclic nucleotide-gated "

CNP : Peptide natriurétique C

COX: Cyclooxygenase

CPI-17: inhibiteur de 17 kDa de la phosphatase de la myosine dépendant de la phosphorylation par la PKC

CRE : « cAMP response element »

CREB : » cAMP response element binding protein »

CREM : « cAMP response element modulator »

DISC1 : « Disrupted In Schizophrenia 1 »

DMEM-F12: Milieu de Culture Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12

eNOS : NO-synthase endothéliale = NOS3

GAPDH: Glyceraldehyde Phospho Deshydrogénase;

ERK : "Extracellular signal-regulated kinase"



FBS: Serum Bovin Foetal;  
GC : Guanylyl-cyclase  
GDP : Guanosine diphosphate  
GMPc : Guanosine 3'5'cyclic monophosphate  
GTP : Guanosine triphosphate  
HARBS : site de liaison de haute affinité du rolipram  
HCN : Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channels  
HPDE4 : PDE4 liant avec une haute affinité le rolipram ??  
IK B $\alpha$ : Sous unité régulant NF B;  
CI<sub>50</sub> : Concentration inhibant 50 % de l'effet  
I<sub>Ca,L</sub> : Courant calcique de type L  
ICER : "Inducible cAMP early repressor"  
iNOS : NO synthase inductible = NOS2  
IP<sub>3</sub>: Inositol Triphosphate;  
ISO : Isoprénaline  
JNK: Facteur nucléaire Junk;  
LPDE4 : PDE4 liant avec une faible affinité le rolipram  
LPS : Lipopolysaccharide  
LTCC : Canaux calciques de type L  
mAKAP :muscle A-kinase anchoring protein  
MAPK : Mitogen activated protein kinase  
MCh: Méthacholine;  
MEK : MAP kinase ERK Kinase  
ML: Muscles lisses;  
MLC: Chaîne légère de la myosine; "  
MLBH: Muscle Lisses des Bronches Humaines;  
MLCK: Myosin Light Chain-Kinase;  
MLCP: Myosin Light Chain Phosphatase;  
MPOC: Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique  $\Leftrightarrow$  BPCO  
NF $\kappa$ B: Facteur Nuclaire Kappa B  
NO : Monoxyde d'azote  
NOS : NO synthase  
PCR: « Polymerase Chain Reaction »  
PDE : Phosphodiesterase des nucleotides cycliques

PDK1 : Protéine kinase dépendante du 3-phosphoinositide  
PEN/STREP: Penicilline et Streptomycine;  
pGC : Guanylyl-cyclase transmembranaire  
PGE1 : Prostaglandine E1  
PI3K : Phosphatidylinositol 3 kinase  
PKA : Protéine kinase A  
PKB/Akt : Protéine kinase B  
PKC : Protéine kinase C  
PKG : Protéine kinase G  
PLA : Phospholipase A  
PLB : Phospholambane  
PLC : Phospholipase C  
PLD : Phospholipase D  
Q-PCR: PCR Quantitative  
RNeasy: Trousse Quiagen pour extraire les ARN totaux  
RT: Reverse Transcriptase  
SDS-PAGE: Sodium Dodécyl Sulfate - Polyacrylamine Gel Electrophoresis  
Src: Facteur oncogénique;  
TCR : « T cell receptor »  
TNF $\alpha$ : "Tumor Necrosis Factor Alpha"

## **PREAMBULE :**

L'inflammation est une réponse immunitaire d'un tissu vivant face à une agression qui peut être provoquée par un agent infectieux (microorganismes pathogènes), des substances toxiques ou chimiques. Elle peut également survenir dans des conditions immunopathologiques liées à une dérégulation du système immunitaire. L'inflammation chronique est alors un processus délétère qui survient dans de nombreuses pathologies humaines et cause à long terme des dommages tissulaires. Les maladies inflammatoires chroniques demeurent à l'heure actuelle un problème de santé publique. Elles regroupent plusieurs grands ensembles de pathologies dont les plus importantes sont: les maladies inflammatoires de l'intestin (maladie de Crohn), les maladies auto-immunes (lupus), les affections pulmonaires récurrentes (asthme). A l'échelle cellulaire, des stimuli variés (mécaniques, chimiques...) activent la phospholipase A<sub>2</sub> des membranes cellulaires entraînant la transformation des phospholipides membranaires en acide arachidonique. Ce dernier est métabolisé en prostaglandines et thromboxane A<sub>2</sub> grâce à une enzyme, la cyclo-oxygénase (COX). Les prostaglandines, la thromboxane A<sub>2</sub> et d'autres médiateurs lipidiques (leucotriène) activent le système immunitaire ce qui aboutit à la mise d'une réaction inflammatoire (Heppelmann et al., 1986; Moncada et al., 1975). Pendant longtemps les anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) et non- stéroïdiens (inhibiteurs de COX) ont contribué à la prise en charge des maladies inflammatoires. Dans les cas d'une inflammation aiguë, ces molécules (qui ont des effets analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires (Gan, 2010) inhibent la cascade de réactions biochimiques concourant à la production de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique et autres médiateurs lipidiques de l'inflammation. Ces anti-inflammatoires constituent une des classes thérapeutiques les plus utilisées dans le monde à l'heure actuelle. Cependant leur bénéfice thérapeutique est terni par la survenue d'effets indésirables d'ordre gastrique et hémorragique potentiellement graves ; ce qui les placent au premier rang de la pathologie iatrogène médicamenteuse (Ng and Chan, 2010). De plus, ces anti-inflammatoires classiques qui sont sur le marché sont dépourvus d'efficacité thérapeutique dans le cas l'inflammation chronique qui est caractérisée par une réaction inflammatoire de forte amplitude et persistante.

Les phosphodiesterases des nucléotides cycliques (PDE1 à PDE11), spécifiquement responsables de l'hydrolyse de l'AMP cyclique et /ou du GMP cyclique (seconds messagers intracellulaires) jouent un rôle majeur dans le contrôle normal et pathologique de la réponse cellulaire. Il a été démontré qu'un taux élevé d'AMP cyclique intracellulaire dans les cellules inflammatoires ou immunocompétentes entraîne une réduction voire la suppression de la

sécrétion des médiateurs de l'inflammation incluant les cytokines chémokines et les espèces réactives de l'oxygène (Brown et al., 2007; Guabiraba et al., 2010 ; Houslay et al., 2005; Salinthonne et al., 2010). Parmi ces PDEs, la famille des PDE4 est majoritairement exprimée dans les cellules immunitaires de l'inflammation (Sanz et al., 2005). Elles se sont alors révélées comme de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour traiter l'inflammation (Bjorgo et al., 2010 ; Sousa et al., 2010). Les PDE4 qui contrôlent majoritairement les niveaux d'AMPc dans la cellule, sont impliquées dans de nombreuses fonctions des cellules immunocompétentes : la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire (Bjorgo and Tasken, 2006). Les inhibiteurs de PDE4 exercent des effets immunosuppresseurs sur les cellules de l'inflammation en bloquant la sécrétion des cytokines (TNF $\alpha$ , IL-6), la migration des neutrophiles vers les sites inflammatoires. La suppression des fonctions des cellules de l'inflammation reste alors une stratégie thérapeutique intéressante pour contrôler l'inflammation de façon globale. Avec le développement des inhibiteurs de nouveaux PDE4, les maladies inflammatoires et chroniques peuvent connaître une nouvelle stratégie de prise en charge thérapeutique. La théophylline, qui est un inhibiteur de non-selectif de PDE a été mise sur le marché depuis très longtemps (avant la découverte des PDE) pour le traitement de l'asthme et le rolipram pour le traitement des troubles cognitifs. Bien que pourvu d'effets anti-inflammatoires puissants, certains inhibiteurs de PDE4 ont des effets secondaires néfastes comme l'émetisme qui est lié à leur haute affinité pour le site de liaison du rolipram (Souness and Rao, 1997).

Récemment, un dérivé 9-benzyladénine, le NCS 613 a été synthétisé à la faculté de pharmacie de Strasbourg comme un nouvel inhibiteur spécifique de PDE4. Le NCS 613 est un puissant inhibiteur de PDE4 ( $IC_{50} = 0,042 \mu M$ ) qui n'a pas montré d'effets émétiques ni d'induction de la sécrétion d'acide gastrique chez le cobaye mais de façon intéressante son administration *in vivo* prévenait la broncho-constriction (Boichot et al., 2000). Le développement de nouveaux inhibiteurs de PDE4 comme anti-inflammatoires est une préoccupation pressante du point de vue thérapeutique, et est aussi d'un intérêt pharmacoeconomique. L'objectif de mon travail est de montrer l'implication des PDE4 dans l'inflammation chronique dans différents modèles et d'étudier les effets d'un traitement chronique au NCS 613 sur la progression de ces pathologies. Ainsi dans mon travail de thèse j'ai étudié d'une part l'effet chronique du NCS 613 sur un modèle de souris lupique et d'autre part sur un modèle humain d'inflammation bronchique. Ainsi j'ai étudié l'inflammation dans un modèle *in vivo* chez la souris lupique (MRL/lpr), un modèle *ex vivo* dans les cellules mononuclées du sang périphériques de patients lupiques et sujet sain stimulées au

lipopolysaccharide bactérien et dans un modèle *in vitro* dans les bronchioles humaines traitées au TNF $\alpha$ .

Ce travail est présenté en deux grands chapitres : la première qui est essentiellement bibliographique et la seconde partie qui décrit les résultats que j'ai obtenus au cours de ces travaux. Ce mémoire de thèse est rédigé selon les directives de guides de rédaction de mémoire de thèse de l'Université de Sherbrooke et celui de l'Université de Strasbourg afin de satisfaire les exigences de la convention de cotutelle.

## I) INTRODUCTION

### I.1. La superfamille des phosphodiesterases des nucléotides cycliques

Les phosphodiesterases des nucléotides cycliques (PDE) appartiennent à la classe d'enzymes **EC 3.1.4.17** et composent la superfamille des métallophosphohydrolases métabolisant spécifiquement les nucléotides cycliques que sont l'adénosine 3',5'-monophosphate cyclique (AMPc) et la guanosine 3', 5'-monophosphate cyclique (GMPc) respectivement en leur nucléotide 5'-monophosphate. Les nucléotides cycliques sont des seconds messagers intracellulaires qui sont impliqués dans la signalisation cellulaire en réponse à différents stimuli. En aval des récepteurs, les phosphodiesterases jouent un rôle crucial dans le contrôle normal ou pathologique des réponses cellulaires. Ils participent à la régulation à la fois de l'amplitude, de la durée du signal et de sa spécificité, en empêchant la diffusion des nucléotides cycliques et l'activation localisée de cibles fonctionnelles (effecteurs). Les PDEs ont été récemment désignées comme de nouvelles cibles thérapeutiques dans différentes pathologies parmi lesquelles on peut citer les maladies cardiovasculaires, pulmonaires, neuronales, auto-immunes et le cancer. Des dérégulations de différentes PDEs dans ces pathologies ont été également reportées (Lugnier, 2006).

#### I.1.1 Les nucléotides cycliques

L'AMPc et le GMPc sont des seconds messagers ubiquitaires générés respectivement par l'adénylyl-cyclase (AC) et la guanylyl-cyclase (GC). Ils sont impliqués dans la transduction du signal hormonal, de neuromédiateurs et autres effecteurs cellulaires. Les deux formes de nucléotides cycliques les plus étudiés sont : la 3',5'- adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et la 3',5'- guanosine monophosphate cyclique (GMPc).

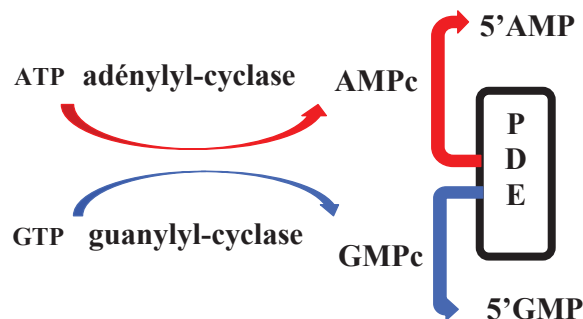


Figure 1 : Métabolisme des nucléotides cycliques par les phosphodiesterases des nucléotides cycliques.

Les nucléotides cycliques contiennent 3 groupes fonctionnels: une base azotée (adénine ou guanine), un sucre qui est le ribose et un phosphate. La conformation cyclique des nucléotides les permet de se lier à des protéines pour favoriser la signalisation intracellulaire. L'augmentation des nucléotides cycliques est déclenchée par des stimuli hormonaux, par des neurotransmetteurs ou des effecteurs cellulaires. Ces stimuli peuvent avoir des effets diverses dépendamment des protéines avec lesquelles elles interagissent. L'AMPc et le GMPc sont capables de se lier à des protéines effectrices comme: les protéines kinases, les canaux ioniques régulés par les nucléotides et les phosphodiesterases. Chez l'homme les nucléotides cycliques agissent comme seconds messagers dans de nombreux processus vitaux et aussi des certaines maladies. Par exemple dans le cerveau, ces nucléotides cycliques sont cruciaux dans la formation de la mémoire à court et long terme. Alors que dans le foie ils coordonnent des fonctions métaboliques impliquées dans la régulation du glucose sanguin (Berthet et al., 1957). Les nucléotides cycliques ont une distribution ubiquitaire et sont largement impliqués dans de nombreuses réponses physiologiques, rendant leurs systèmes de régulation particulièrement intéressants dans une perspective thérapeutique (Houslay, et al., 2009). Il faut noter que la ADP Ribose cyclique (ADPRc) est aussi un nucléotide cyclique de l'adénine ressemblant à AMPc, avec 2 groupes phosphates et 2 riboses. La ADPRc est également un second messenger impliqué dans la signalisation intracellulaire du calcium (Guse, 2004b). Il est un modulateur physiologique du récepteur de la ryanodine (RyR), qui stimule la libération du calcium induit par une concentration basse de calcium intracellulaire. L'activation du RyR par de fortes concentrations de caféine est en partie due au fait que celle-ci mime la cADPR au niveau de son site de liaison (Guse, 2004a).

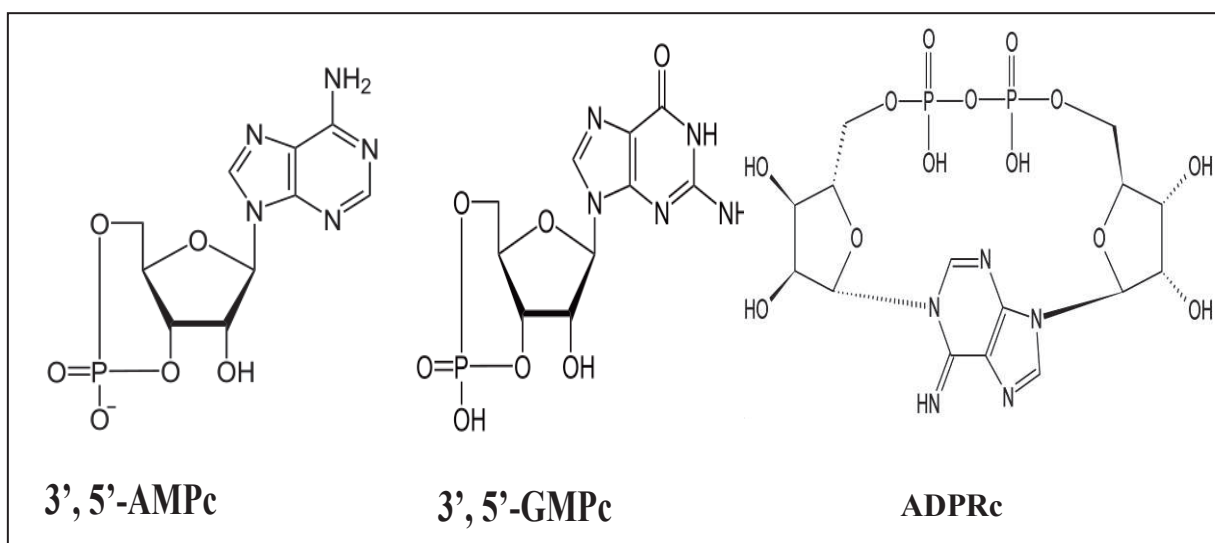


Figure 2 : représentation de la structure chimique des trois nucléotides cycliques naturels rencontrés chez les mammifères.



### I.1.1.1 L'AMPc et ces cibles intracellulaires

Le second messenger AMPc, a été découvert dans les années 50 par Sutherland au cours de ses travaux sur la régulation hormonale du métabolisme par l'épinephrine dans le cœur et le foie de mammifère (Berthet et al., 1957a; Berthet et al., 1957b). L'AMPc est ubiquitairement synthétisée à partir de l'ATP par les adényl-cyclases (EC 4.6.1.1). L'adényl-cyclase est activée par diverses molécules de signalisation à travers les récepteurs couplés aux protéines Gs (stimulatory) et aussi inhibée par les récepteurs couplés aux protéines Gi (inhibitory). Chez les mammifères, il en existe deux classes d'adényl-cyclases : les adényl-cyclases transmembranaires (tmACs) et les adényl-cyclases solubles (sAC). L'adényl-cyclase «soluble» (sAC) de découverte récente, est présente dans certains compartiments cellulaires, notamment le noyau, les mitochondries, le centriole et est régulée par des signaux intracellulaires comme les ions bicarbonates ou le calcium (Zippin et al., 2003). Cette distribution subcellulaire prouve que les adényl-cyclases sont fermement ancrées à proximité des effecteurs de l'AMPc (Zippin et al., 2003). Dans le noyau, elle représenterait une autre voie d'activation du facteur de transcription CREB.

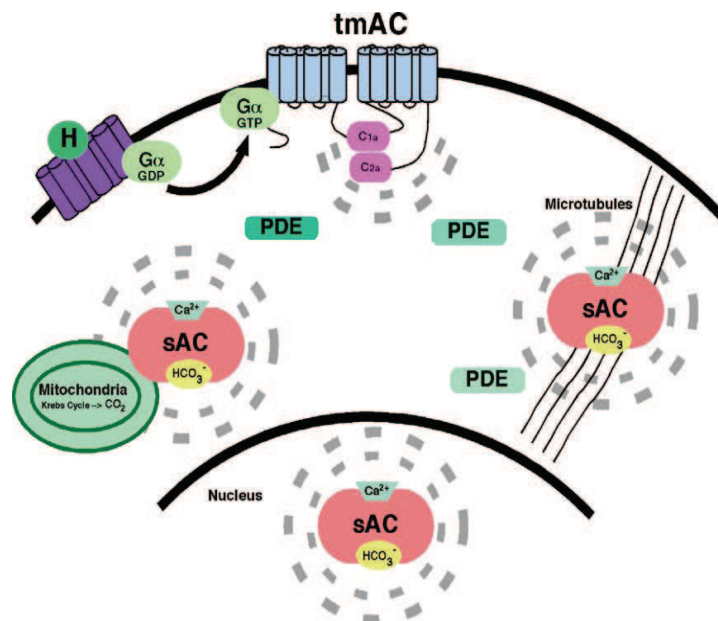


Figure 3. Localisation subcellulaire des AC. Le second messenger est formé par l'adényl-cyclase, agit sur ses cibles et est dégradé par les PDEs ce qui conduit à la formation de micro-domaines d'AMPc à l'intérieur de la cellule. La lettre H correspond au récepteur activant les récepteurs des hormones. Les pointillées représentent les limites des sphères de diffusion respectivement formées par l'AC (Kamenetsky et al., 2006).

Chez les mammifères les effets de l'AMPc sont régulés par 3 types de protéines effectrices : la protéine kinase A dépendante de l'AMPc ou « cAMP dependant protein kinase A » (PKA), les protéines échangeuses de GTP activées par l'AMPc ou « exchange proteins activated by cAMP (EPACs)» et les canaux ioniques régulés par les nucléotides cycliques ou «cyclic nucleotide gated ion channels (CNGs et HCNs) ». Plus récemment, il a été identifié une quatrième cible potentielle de l'AMPc qui serait la PDE10 (Hofbauer et al., 2008).

#### **I.1.1.1.1 La protéine kinase A dépendante de l'AMPc**

La PKA est une famille d'enzyme (EC 2.7.11.11) dont l'activité est dépendante de l'AMPc. Il existe deux types de PKA : la PKA de types I et la PKA de types II. Elles diffèrent par la nature de leurs sous unités régulatrices nommées RI et RII. Ces deux types diffèrent également par leurs localisations subcellulaires. Cette famille ne doit pas être confondue avec "l'AMP-activated protein kinase" ou AMPK qui a un effet opposé à la PKA. Les PKAs sont présentes au niveau du cytosol mais aussi au niveau membranaire (noyau, réticulum, appareil de Golgi, mitochondrie...) grâce aux protéines d'ancrage AKAP (A-Kinase Anchoring Proteins). Les PKA sont ainsi souvent associées à leurs protéines cibles dans des complexes de signalisation (Negro et al., 2008). Chaque holoenzyme de PKA est constituée de deux sous-unités régulatrices et deux sous-unités catalytiques. Quand le niveau d'AMPc est bas l'enzyme est inactive. Suite à une augmentation du taux d'AMPc, le substrat se lie aux deux sous-unités régulatrices favorisant la libération des sous-unités catalytiques. Les sous-unités catalytiques libres peuvent alors phosphoryler les protéines substrats en transférant le groupement phosphate de l'ATP sur un résidu sérine ou thréonine. Cette phosphorylation entraîne généralement un changement dans l'activité du substrat. De ce fait les PKAs sont présentes dans diverses cellules et agissent sur différents substrats. La PKA peut directement phosphoryler les protéines substrats et ainsi augmenter ou diminuer leurs activités. Une des cibles de la PKA est le « cAMP Responsive Element Binding » CREB.

CREB est un facteur de transcription présent dans toutes les cellules et capable de se d'interagir directement avec l'ADN par sa fixation sur les séquences CRE en induisant la transcription de certains gènes. Le « cAMP Responsive Element » ou CRE (palindrome de 8 paires de bases TGACGTCA), est un élément de réponse crucial dans les cascades moléculaires impliquant l'AMPc (Sands and Palmer, 2008). Il existe deux isoformes de CREB : CREB-A et CREB-B. Le CREB fait partie de la famille des facteurs de transcription à domaine bZIP (région basique riche en leucine), de même que CREM et ATF-1. Plusieurs

voies de signalisations cellulaires peuvent mener à l'activation de CREB (qui est activée dans les voies de signalisation dépendantes de l'AMPc). Le stimulus extracellulaire augmente l'AMPc intracellulaire aboutissant à l'activation de la PKA, qui a son tour phosphoryle CREB sur la sérine en position 133. La phospho-CREB, ainsi activée recrute les coactivateurs transcriptionnels tels que CBP (pour CREB-binding protein) et P300 qui de par leurs fonctions acétyltransférases vont faciliter sa fixation à l'ADN et induire la transcription de gènes (Servillo, et al., 2002). Ce mécanisme prend généralement un temps plus ou moins long (quelques heures à des jours). Les antidépresseurs ont des effets thérapeutiques en sur-activant CREB via la voie de l'AMPc, permettant ainsi la synthèse de protéines intervenant dans la protection et la survie cellulaire. CREB est également impliqué dans la dépendance aux drogues.

Les domaines régulateurs de la PKA sont importants pour sa localisation subcellulaire grâce aux protéines d'ancrage AKAP. Les AKAP se lient aux sous-unités régulatrices de la PKA et à des composantes organelles dans le compartiment membranaire, du cytosquelette et nucléaire. Les AKAP favorisent l'ancrage et la formation de complexes appelés signalosomes mettant à proximité les adénylyl-cylases, la PKA, les phosphodiesterases et autres effecteurs (Epac). Les PDE contribuent au maintien de taux bas d'AMPc dans les cellules au repos. Dans le cas où les cellules sont stimulées, le taux d'AMPc augmente par l'activité de l'adénylyl-cyclase. La PKA active alors les PDE qui hydrolysent l'AMPc ramenant le taux d'AMPc à un niveau basal. De cette façon l'AMPc n'est pas répartie de façon homogène dans la cellule ; mais sa distribution spatio-temporelle est compartimentalisée (Houslay, 2010).

La signalisation par la PKA est nécessaire dans nombreux organismes vivants et processus de la vie. Différentes réponses cellulaires sont médiées par la PKA. Elle est alors impliquée dans de nombreux processus physiologiques notamment : la régulation métabolique du glucose et des lipides, la régulation du rythme cardiaque, la contraction musculaire, la modulation du système immunitaire. Pour exemples on peut citer sa fonction dans les tissus suivants :

- dans le foie et les muscles squelettiques, la PKA provoque l'augmentation de la glyco-génolyse par phosphorylation des sous-unités et de la phosphorylase-kinase (Rich and Karpen, 2002),
- dans les adipocytes, la PKA phosphoryle la triglycérider-lipase et provoque l'augmentation de la lipolyse (Enns et al. 2010),
- au niveau du muscle cardiaque, l'activation locale de la PKA augmente l'inotropisme en phosphorylant les canaux calciques voltage-dépendants d'une part (Petrovic et al., 2008),

et les pompes à calcium de la membrane plasmique (PMCA) et du réticulum (SERCA) d'autre part (Shattock, 2009; Song et al., 2005 ; Lehnart et al., 2005),

- dans les muscles lisses, la phosphatase de la chaîne légère de la myosine est phosphorylée par la PKA, produisant une relaxation et des effets de type bronchodilatation ou vasodilatation (Hartshorne et al., 1998) ; de même que la PKA dephosphoryle la MLCK pour la broncho-relaxation.

- la PKA active également certains facteurs de transcription qui vont se fixer sur des promoteurs de gènes (Bjorgo et al., 2010),

- dans les cellules de l'immunité la PKA régulent les lymphocytes T en induisant une réponse immunosuppressive, une baisse de la prolifération et de la différenciation.

- il existe d'autres cibles de la PKA, comme par exemple les phosphodiésterases des nucléotides cycliques de type 1, 3 et 4.

#### **I.1.1.1.2 Les « Exchange Proteins Activated by cAMP »**

Les protéines Epac, pour « Exchange Proteins Activated by cAMP », constituent une famille de « Guanine Nucleotide Exchange Factors » régulés par l'AMPc (AMPc-GEFs). Il en existe deux variants : Epac1 et Epac2. Epac1 et Epac2 sont des médiateurs importants de la signalisation de l'AMPc. Ces protéines sont impliquées dans divers processus cellulaires comme l'adhésion régulée par les cytokines et la formation des jonctions cellule-cellule, le contrôle de l'insuline et la neurotransmission. Ils agissent souvent de concert avec la PKA. L'Epac1 contient un site de liaison de l'AMPc et est présente de façon ubiquitaire dans le cœur, alors que Epac2 se concentre surtout dans le cerveau, et certaines régions du foie et des îlots pancréatiques de Langerhans (Springett et al., 2004). Epac 2 contient deux sites de liaison de l'AMPc : un domaine de faible affinité d'importance incertaine désigné comme A, et un domaine de plus grande affinité physiologiquement pertinent désigné comme B. Le  $K_d$  de liaison de l'AMPc à Epac1 est de 2,8  $\mu\text{M}$ , alors que pour la liaison aux sites d'Epac2 A et B présentent un  $K_d$  de 87  $\mu\text{M}$  et 1,2  $\mu\text{M}$  respectivement (Christensen et al., 2003). Ces facteurs d'échange sont activés par l'AMPc et sont capables de stimuler l'échange de GDP par du GTP (de Rooij et al., 1998). Ils permettent donc de faire le lien entre le signal AMPc et la protéine Rap. La protéine Rap (Rap1, Rap2), une GTPase de la famille Ras, dont les effets incluent l'adhérence cellulaire régulée par les intégrines, la formation d'une barrière par les cellules endothéliales vasculaires, la formation de jonctions gap au niveau cardiaque. Les protéines Epac représentent ainsi une voie de signalisation de l'AMPc indépendante de la PKA. Ils peuvent cependant réguler des processus physiologiques seuls et/ou de concert avec

la PKA : la régulation du calcium et du rythme cardiaque, la contraction du muscle lisse, l'apprentissage et la mémoire, la prolifération cellulaire, la différenciation et l'inflammation (Grandoch et al., 2010).

### **I.1.1.1.3 Les canaux ioniques régulés par les nucléotides cycliques**

Les canaux ioniques activés par les nucléotides cycliques comportent 6 segments transmembranaires et une boucle P, ainsi qu'un domaine de liaison des nucléotides cycliques présentant une perméabilité cationique non sélective permettant des flux de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{2+}$ . Quatre sous unités de ces isoformes forment un canal fonctionnel. Les nucléotides se lient au récepteur cytoplasmique et ouvre le pore qui permet le passage du  $\text{Na}^+$  et du  $\text{Ca}^{2+}$  et la dépolarisation de la membrane. Le calcium qui entre dans la cellule se lie à la calmoduline, formant un complexe qui active les PDE1. Ces dernières hydrolysent les nucléotides permettant un rétrocontrôle négatif du canal. Les canaux ioniques régulés par les nucléotides cycliques jouent un rôle important dans les mécanismes sensoriels, olfactifs et la vision. Les canaux HCN (Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated cation channels) sont activés par hyperpolarisation. Ils sont principalement présents dans le cœur, où ils interviennent dans la régulation du rythme cardiaque, et notamment dans le cerveau. Leur ouverture est potentialisée par liaison de l'AMPc ou du GMPc sur l'extrémité C-terminale, avec une affinité dix fois supérieure pour l'AMPc (Biel et al., 2002). Les canaux CNG (Cyclic Nucleotide-Gated ion channels) sont activés directement par liaison de l'AMPc ou du GMPc sur leur extrémité C-terminale et sont peu sensibles aux variations de potentiel. Ils sont présents notamment au niveau de la rétine et des neurones olfactifs. Au niveau des photorécepteurs rétiniens, ils sont principalement activés par le GMPc. Dans les neurones olfactifs, AMPc et GMPc ont une affinité semblable pour les CNG (Kaupp and Seifert, 2002; Stevens et al., 2001).

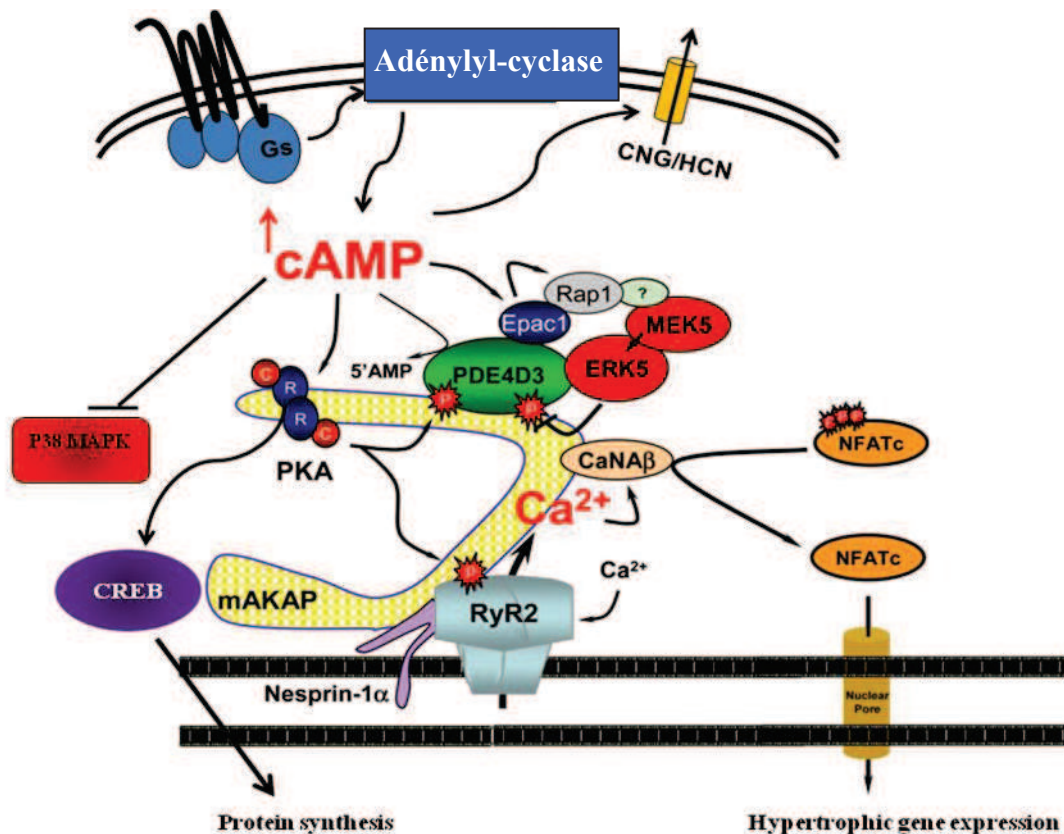


Schéma 1 : Les signalosomes dans la signalisation intracellulaire par l'AMPc. La formation d'un complexe de signalisation (signalosome) est favorisée par les mAKAP qui regroupent en un complexe la PKA, les PDEs et les EPACs et autres effecteurs dans une cellule donnée. L'augmentation de l'AMPc suite à l'activation des adénylyl-cyclases par les protéines Gs conduit à des réponses cellulaires diverses dépendantes du signalosome. Par exemple, dans les myocytes l'AMPc peut activer la PKA qui phosphoryle le récepteur à la ryanodine 2 pour diminuer le  $[Ca^{2+}]_i$  et favoriser la relaxation. L'AMPc peut activer les canaux ioniques (CNG et HCN) pour empêcher l'entrée de  $Ca^{2+}$  et favoriser la relaxation. La PKA phosphorylée peut aussi phosphoryler les CREB et par cascade d'activation favoriser la synthèse des protéines. L'augmentation de l'AMPc intracellulaire peut inhiber la voie de signalisation p38 MAPK et exercer un effet antiinflammatoire. Les effets de l'AMPc sur ses cibles effectrices sont terminés par les PDEs qui l'hydrolysent en 5'AMP. (adapté de Welch et al., 2010).

### I.1.1.2 Le GMPc et ses cibles cellulaires

Au début des années 1970, le GMPc a été identifié comme un autre second messager intracellulaire. Le GMPc est synthétisé par la guanylyl-cyclase (GC) activée par des peptides hormonaux ou le monoxyde d'azote NO qui stimule la synthèse du GMPc. Les GCs sont retrouvées au niveau de la membrane plasmique ou au niveau transmembranaire (« particulate GC » ou pGC) et dans le cytosol (« soluble » GC ou sGC) (Lucas et al., 2000). Les peptides natriurétiques sont une famille d'hormones qui influent sur les systèmes cardiovasculaires et endocriniens par l'intermédiaire de leurs actions sur la diurèse, la natriurèse, la vasorelaxation, et l'inhibition de la rénine et de l'aldostérone (Nishikimi et al., 2006). Ils activent la voie de signalisation du GMPc. Les peptides natriurétiques endogènes sont de puissants inhibiteurs de



l'hypertrophie cardiaque. Ils sont composés de trois membres: le peptide natriurétique auriculaire (ANP) également appelé facteur atrial natriurétique (ANF), le peptide natriurétique cérébral ou de type B (BNP), et le peptide natriurétique de type C (CNP). Le NO active les sGC ; l'ANP et BNP activent les enzymes particulières de même que le CNP.

Le GMPc est capable de se liés à trois types effecteurs cellulaires dans la transduction du signal intracellulaire: les protéines kinases dépendantes du GMPc (PKG), les canaux ioniques régulés par les nucléotides cycliques et certaines familles de phosphodiésterases (Selemidis et al., 2007). Les PKGs sont sélectivement activées par le GMPc et ont une activité de phosphorylation des protéines cibles par transfert d'un groupement phosphate d'une molécule d'ATP sur les résidus séryls et thréonyls.

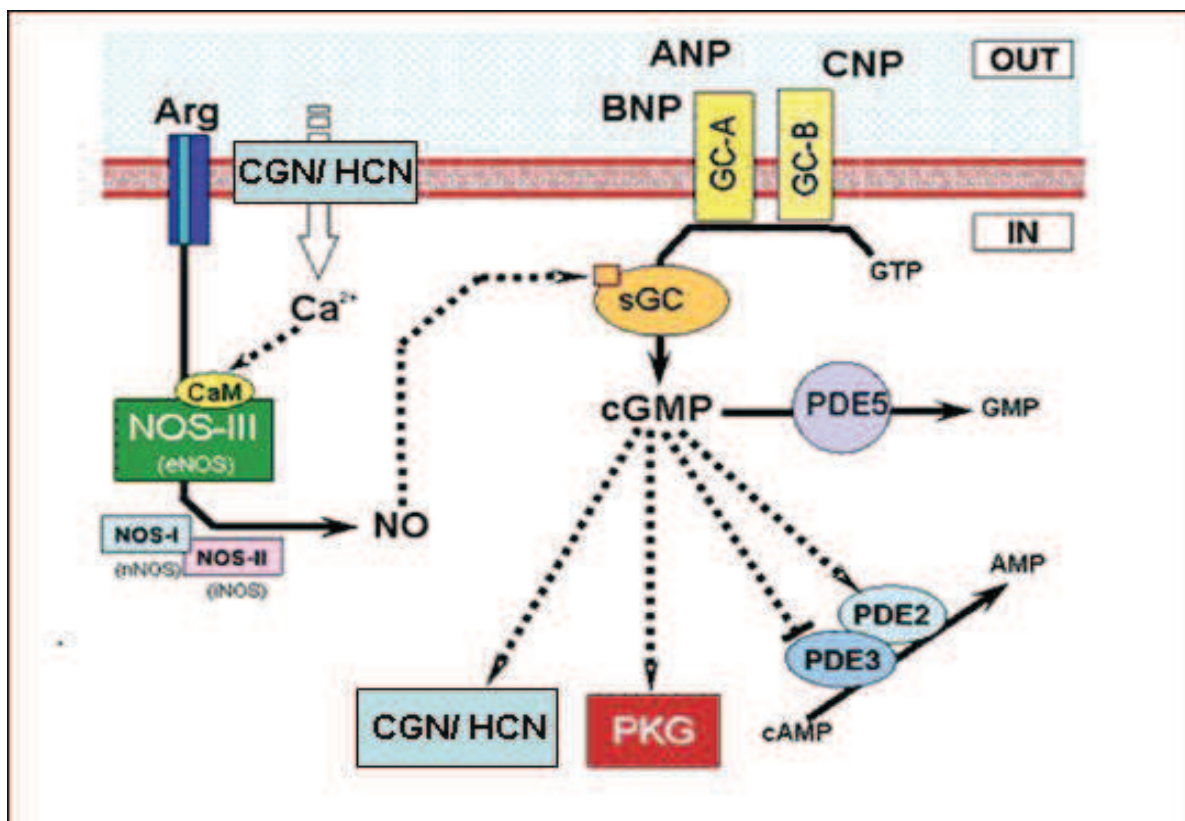


Figure 4. La voie de transduction du signal du GMPc. Les lignes continues représentent les effets du GMPc. Abbreviations : atrial natriuretic peptide (ANP); L-arginine (Arg), brain natriuretic peptide (BNP); calmoduline (CaM); C-type natriuretic peptide (CNP); particulate guanylyl cyclase type A or type B (GC-A GC-B). NO synthetase I, II and III (NOS-I, NOS-II et NOS-III). Les guanylyl-cyclases sont stimulées par les peptides natriuretiques (ANP et BNP se lient à GC-A, comme CNP se lie à GC-B). Les GC solubles sont aussi activées par le NO synthétisé par les NOS. Les NOS sont activées par le complexe CaM et la L-arginine. Le GMPc exerce ses effets cellulaires en activant: les protéines kinases dépendante du GMPc (PKG), qui à son tour activent les canaux ioniques régulés par les nucléotides cycliques (CNG et HCN) et certaines familles de phosphodiésterases PDE de type 2, 3 et 5). Adapté de (Selemidis et al., 2007).



### **I.1.1.2.1 Les Protéines kinases G**

Les PKGs sont des protéines sérine/thréonine kinases activées par le GMPc. Elles phosphorylent de nombreuses cibles cellulaires et sont impliquées dans la régulation de la relaxation du muscle lisse, dans la fonction plaquettaire, la spermatogenèse, la division cellulaire et la synthèse de l'ADN (Birschmann and Walter, 2004). Les PKGs chez les mammifères sont codées par deux gènes. Il en existe deux types de PKG qui sont essentiellement présents dans les muscles lisses vasculaires. La PKGI est surtout cytosolique et intervient dans plusieurs effets cellulaires. Elle permet la relaxation des muscles lisses (vasodilatation, bronchodilatation...) par inactivation des récepteurs de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>) et du phospholambane (PLB), et par activation de la phosphatase de la chaîne légère de la myosine. La phosphorylation des canaux calciques de type L (LTCC) ainsi que des canaux potassiques activés par le Ca<sup>2+</sup> contribuent également à la relaxation des muscles lisses vasculaires et à la contractilité cardiaque (Surks, 2007). Elle favorise aussi l'activation des polynucléaires neutrophiles et l'activation des plaquettes sanguines (Gambaryan et al., 2008). La PKG-II est principalement associée aux membranes des entérocytes de l'intestin grêle, où elle phosphoryle le CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator).

Les PKG et les PKA ayant toutes des activités séryl/thréonyl kinases, peuvent phosphoryler les mêmes cibles, ce qui explique que certains effets du GMPc et de l'AMPc soient semblables. Cependant, ces similitudes ne sont que partielles en raison de la répartition tissulaire des cyclases ainsi que leurs différents mécanismes de régulation et leur distribution subcellulaire par les AKAPs. Le GMPc joue un rôle important dans la relaxation les muscles lisses en activant les canaux ioniques. Comme l'AMPc, le GMPc active les CNG et HCN tout en modulant la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.

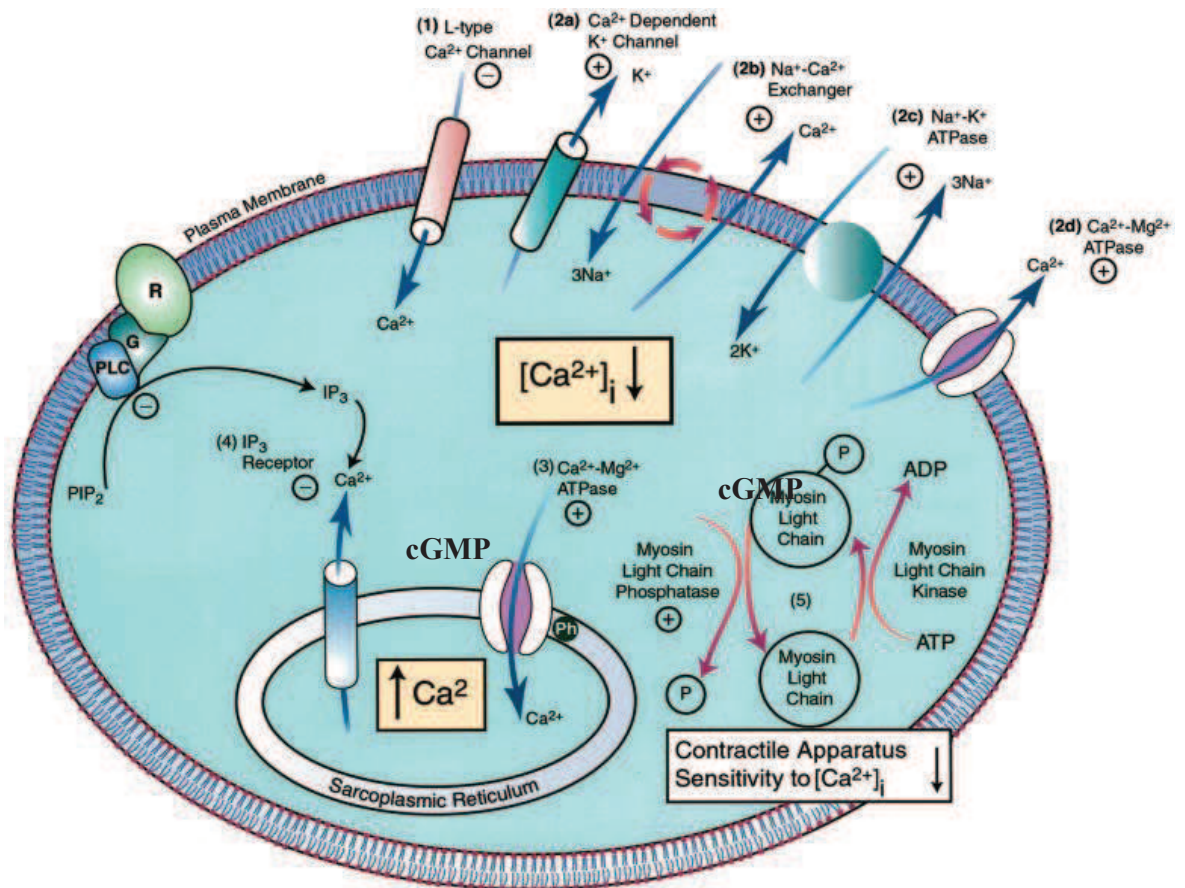


Figure 5. Mécanismes moléculaires de la relaxation des muscles lisses vasculaires régulés par le GMPc. Abréviation : R, récepteur; G, G protéine; PLC, phospholipase C; IP<sub>3</sub>R, récepteur à l'IP<sub>3</sub>. Le GMPc induit la relaxation des muscles lisse en réduisant le  $[Ca^{2+}]_i$  et en désensibilisant l'appareil contractile du  $Ca^{2+}$ . Le GMPc réduit la  $[Ca^{2+}]_i$  en inhibant (1) l'entrée du  $Ca^{2+}$  travers les canaux de types L, (2) augmentant la sortie du  $Ca^{2+}$  par l'activation de : la pompe  $Ca^{2+}/ATPase$  (2d) et l'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$  (2b). Le GMPc peut aussi hyperpolariser la membrane par l'activation de la pompe  $Na^+/K^+ ATPase$  (2c) et le canal  $K^+$  (2a), comme il peut augmenter la sortie du  $Ca^{2+}$  par l'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$ . Le GMPc peut (3) favoriser la séquestration du  $Ca^{2+}$  par l'activation de la pompe- $Ca^{2+}/ATPase$  du reticulum sarcoplasmique (phospholambane) et (4) diminuer la mobilisation du  $Ca^{2+}$  par l'inhibition des agonistes induisant la formation de l'IP<sub>3</sub> induit par les agonistes ou par l'inhibition du récepteur à l'IP<sub>3</sub> du reticulum sarcoplasmique. Le GMPc désensibilise l'appareil contractile du  $Ca^{2+}$  en activant probablement la « myosine light chaine phosphatase », ce qui résulte en la déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine 20 kDa (Lucas et al., 2000).

### I.1.1.2.2 Les effets de la PKA et PKG sur la relaxation du muscle lisse

Les nucléotides cycliques jouent des rôles important aussi dans la relaxation du muscle lisse en activant les protéines kinases. Celles-ci modulent la relaxation en déphosphorylant par divers mécanismes la chaîne légère de la myosine (pour revue (Murthy, 2006)).



protéine kinase A (PKA) protéine kinase G (PKG), les canaux ioniques activés par les nucléotides cycliques ou «cyclic nucleotide gated ion channels » (CNG, HCN), la « cAMP stimulated GTPase exchange factors » (EPAC) à travers lesquelles ils régulent des processus cellulaires de diverses façons. Les nucléotides cycliques et leurs enzymes spécifiques ont été découverts presque simultanément il ya plus de 40 ans aujourd'hui (pour revue Sutherland, 1972). De nos jours 11 familles de PDE ont été caractérisées chez les mammifères sur la base de leur séquences en acides aminés, la spécificité pour leurs substrats (AMPC, GMPC ou les deux), leurs régulateurs endogènes et exogènes (calcium-calmoduline, GMPC) et enfin leurs propriétés pharmacologiques (inhibiteurs spécifiques). Chaque famille comprend 1 à 4 gènes distincts soit un total de 20 gènes de PDE chez les mammifères (revue par (Lugnier, 2006)). Ces gènes codent pour de multiples protéines générées par l'épissage alternatif ou l'utilisation de multiples promoteurs conduisant ainsi à la synthèse de nombreuses de protéines enzymatiques.

### **I.1.2.1 Structures comparatives et nomenclature des PDEs**

Les PDEs, chez les mammifères ont une structure de base commune, avec un domaine catalytique hautement conservé dans la partie C terminale et un domaine régulateur située à la partie N terminale. Le domaine catalytique constitue le cœur de la protéine avec des motifs HD(X2)H(X4) commun chez les mammifères (Heikaus et al., 2009) ; contenant la séquence consensus du site de liaison du métal :  $Zn^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$ . La partie N-terminale contient des séquences conservées pour chaque famille de PDE. Ce domaine est impliqué dans la régulation du domaine catalytique et dans la localisation subcellulaire des PDEs. Le domaine N-terminale contient les sites de liaison des petites molécules comme les nucléotides cycliques et de phosphorylation des kinases (PKA MAPK, ERK, Akt, CaM Kinase) (McCahill et al., 2008; Moorthy et al., 2010 ; Richter et al., 2008).

Le domaine N-terminal régulateur contient notamment des domaines GAF liant le GMPC (PDE2, PDE5, PDE6, PDE10 et PDE11), un site de liaison des complexes calcium-calmoduline (PDE1), des sites de phosphorylation par la PKA (PDE1, PDE3, PDE4), par la PKB (PDE3) et par ERK (PDE4), un domaine PAS (PDE8) et des domaines UCR (PDE4) (Lugnier, 2006).



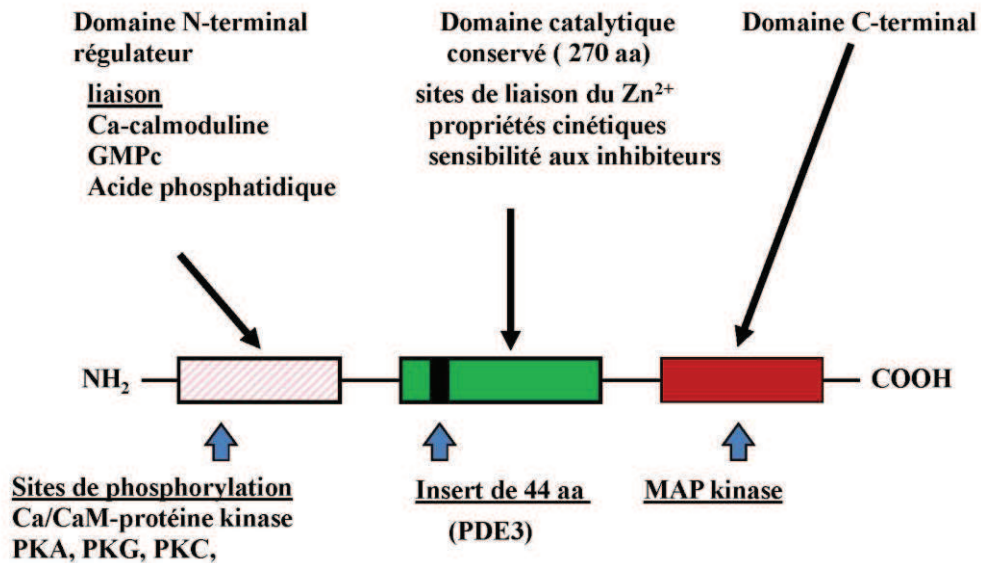


Schéma 2 : Structure comparative de PDE (D'après (Lugnier, 2006).

La nomenclature de ces enzymes indique en chiffre arabe, la famille de PDE suivie d'une lettre capitale pour le gène à l'intérieur de cette famille et un second chiffre indique le variant du produit dérivé du même gène (Beavo et al., 1994). Exemple : PDE5A1, il s'agit de l'isoforme de PDE de la famille 5, codé par le gène A et provenant du variant 1. Tout comme les phosphatases, les PDEs sont des régulateurs négatifs de la voie de signalisation des nucléotides cycliques dans les cellules et sont une composante essentielle à la signalisation intracellulaire. Les PDE ont un rôle essentiel dans la spécificité et la compartimentalisation de la signalisation et sont indispensables au maintien de l'homéostasie, à l'adaptation cellulaire et l'interaction ou « crosstalk » entre les différentes voies de signalisations cellulaires (Schillace and Carr, 2006). Les inhibiteurs de PDE sont des composés largement utilisés pour leurs propriétés pharmacologiques variées incluant les effets cardiotoniques, vasodilatateurs, relaxants des muscles lisses, antidépresseurs, anti-thrombotiques, bronchodilatateurs, anti-inflammatoires et renforçants la fonction cognitive (Adamo et al., 2010, Movsevia et al., 2009 ; Ghofrani and Grimminger ; Conti and Beavo, 2007 ;).

Le tableau suivant récapitule la classification des 11 familles de PDE chez les mammifères selon les gènes qui les codent (séquence en acides aminés), les substrats qu'elles hydrolysent et leurs propriétés pharmacologiques. Cette classification est suivie d'un schéma illustrant le structure de chaque famille de PDE. Nous ferons le rappel succinct des 5 premières familles de PDE qui sont les mieux étudiées.

**Tableau 1: Classification des PDE (Ishiwata et al., 2007; Smith et al., 2004; van der Staay et al., 2008 ; Lugnier, 2006 ; Bender and Beavo, 2006)**

Famille PDE	Gène	Substrat	Km ( $\mu$ M) AMPc ; GMPc	Propriétés	inhibiteurs spécifiques	Distribution tissulaire ou cellulaire	Distribution subcellulaire
PDE1	1A	AMPc, GMPc	1-30 ; 3	activée par Ca-CaM	Nimodipine	Muscle lisse, cœur, poumon, cerveau, sperme	cytosolique
	1B				Vinpocetine	Neurones, lymphocytes, macrophages, muscle lisse	Cytosolique
	1C					Cerveau, cœur, sperme, muscle lisse, épithélium olfactif	Cytosolique
PDE2	2A	AMPc, GMPc	15 ; 15	activée par GMPc	EHNA, BAY 60-7550	Cerveau, cœur, plaquettes, macrophages, cellules endothéliales	PDE2A1 cytosolique PDE2A2 et PDE2A3 liées à la membrane
PDE3	3A	AMPc, GMPc	0,2 ; 0,1	inhibée cGMP	Cilostamide milrinone Enoximone	Cœur, muscle lisse vasculaire, plaquettes, rein, oocyte	Cytosolique et liée à la membrane
	3B					Adipocytes, muscle lisse vasculaire, hépatocytes, rein, lymphocytes T, macrophages	Associée à la membrane du réticulum sarcoplasmique et des fractions microsomales
PDE4	4A	AMPc	4 ; > 3000	insensible cGMP	Rolipram Piclamilast Roflumilast Cilomilast	Ubiquitaire sauf plaquettes	Liée à la membrane
	4B					ubiquitaire sauf plaquettes	Liée à la membrane
	4C					Poumon, testicules, cerveau notamment	Principalement cytosolique
	4D					Ubiquitaire sauf plaquettes	Cytosolique et liée aux membranes
PDE5	5A	GMPc	150 ; 1	phosphorylée par PKA/PKG	Zaprinast, DMPPO, sildenafil, Tadalafil, Vardenafil, Udenafil	Plaquettes, muscle lisse, poumon, rein, muscle squelettique, cœur	Cytosolique
PDE6	6A	GMPc	2000 ; 60	activée par Transducine	Zaprinast, DMPPO, E4021, Sildenafil, NT-702	Bâtonnets des photorécepteurs Bâtonnets des photorécepteurs	Cytosolique
	6B					Cônes des photorécepteurs	Cytosolique
PDE7	7A	AMPc	0,2 > 1000	insensible au Rolipram et l'IBMX	BRL50481 ASB16165	Cellules immunitaires, cœur, muscle squelettique, cellules endothéliales, foie, testicule	Cytosolique
	7B					Cerveau, cœur, muscle squelettique, pancréas, testicule	Cytosolique
PDE8	8A	AMPc	0,06 ; -	insensible à l'IBMX	Inconnu inconnu	Testicules, rate, ovaire, colon, rein, intestin	Cytosolique et liée aux membranes
	8B					Cerveau et thyroïde	Cytosolique et liée aux membranes
PDE9	9A	AMPc, GMPc	- ; 0,17	Inconnue	BAY 73-6691	Rein, rate, cerveau, tissus gastro-intestinaux, prostate	Cytosolique et liée aux membranes
PDE10	10A	AMPc, GMPc	0,05 ; 3	Inconnue	papavérine	-	Cytosolique et liée aux membranes
PDE11	11A	AMPc, GMPc	0,7 ; 0,5	Inconnue	-	Muscle squelettique, prostate, testicules, glandes salivaires, foie	Cytosolique

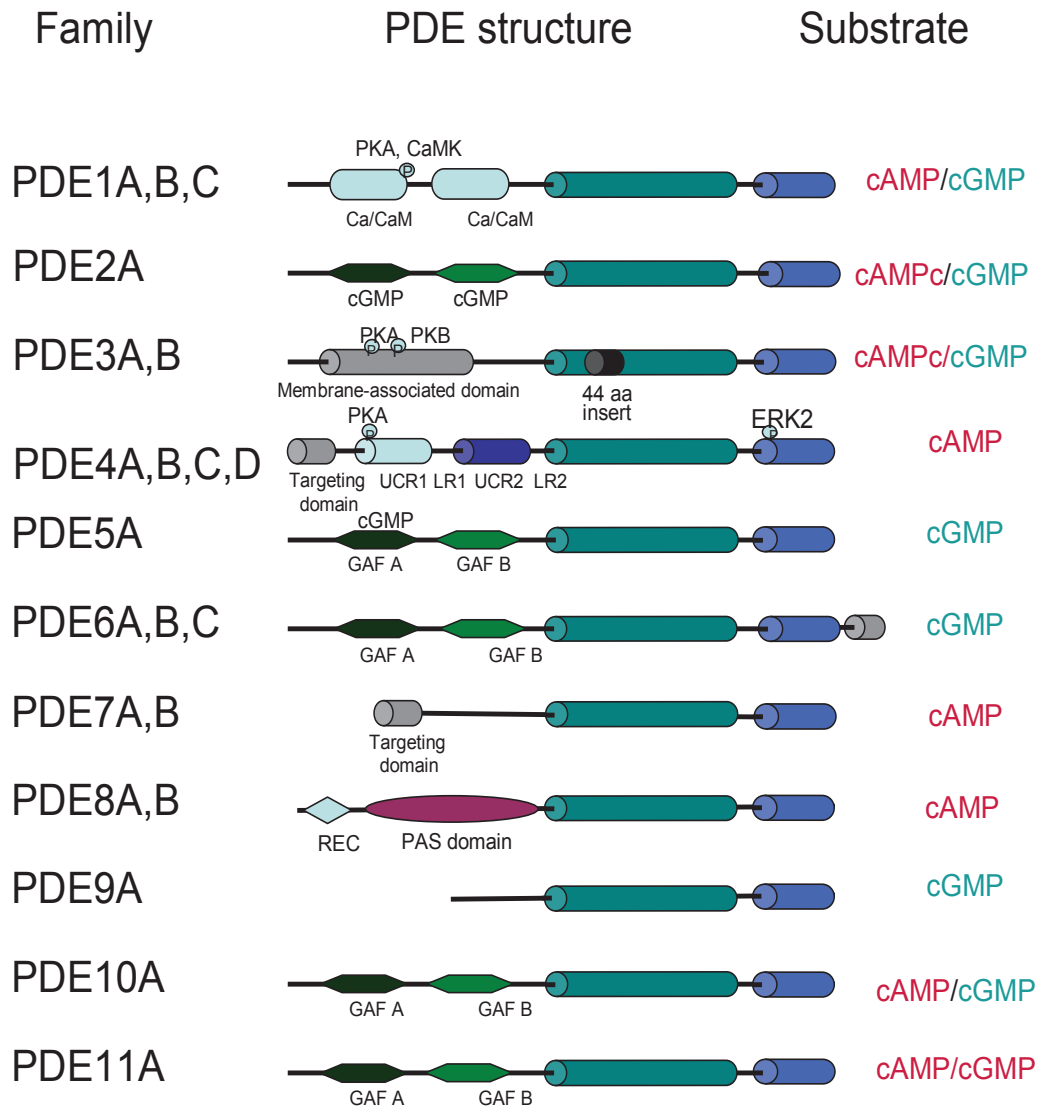


Schéma 3 : Structure des 11 familles de PDE (Lugnier, 2006).

Les PDEs par leurs localisations tissulaires, cellulaires et subcellulaires gouvernent de nombreuses fonctions biologiques (Lakics et al., 2010; Montorsi et al., 2004; Rao and Xi, 2009). Certaines isoformes de PDE sont impliquées dans des pathologies et alors reconnus comme cibles thérapeutiques pour le traitement de ces maladies. On peut citer entre autres :

- Les inhibiteurs de PDE1: troubles de la mémoire, athérosclérose
- Les inhibiteurs PDE2: troubles de la mémoire
- Les inhibiteurs PDE3: traitement aiguë des insuffisances cardiaques.
- Inhibiteurs de PDE4: anti-inflammatoire, traitement de l'Asthme et la BPCO.
- Inhibiteurs de PDE5: Trouble d'érectilité masculine (Sildénafil = Viagra), hypertension pulmonaire.



### I.1.2.2 Les différentes familles de PDEs et leurs rôles physiologiques.

Les phosphodiésterases des nucléotides cycliques régulent négativement le taux des nucléotides cycliques dans la cellule. Elles permettent la terminaison du signal relayé par les nucléotides cycliques. Le GMPc activent les PDE 2, 5, 6, 10 en se liant aux domaines GAF et inhibent d'autres PDEs par inhibition compétitive au niveau du site catalytique. Par exemple, la PDE3 qui possède une plus grande affinité pour le GMPc mais dont la vitesse d'hydrolyse est faible, réduit de ce fait l'hydrolyse de l'AMPc. Les 5 premières familles de PDEs (PDE1-PDE5) sont les mieux caractérisées et il existe des inhibiteurs spécifiques permettant d'étudier leurs rôles physiopathologiques. Les autres familles de PDEs font l'objet d'intenses investigations et de nouveaux inhibiteurs sont synthétisés. Du point de vue clinique, les phosphodiésterases sont des enzymes qui sont très souvent prises des cibles pharmacologiques du fait de leur distribution tissulaire, leurs propriétés structurales et fonctionnelles.

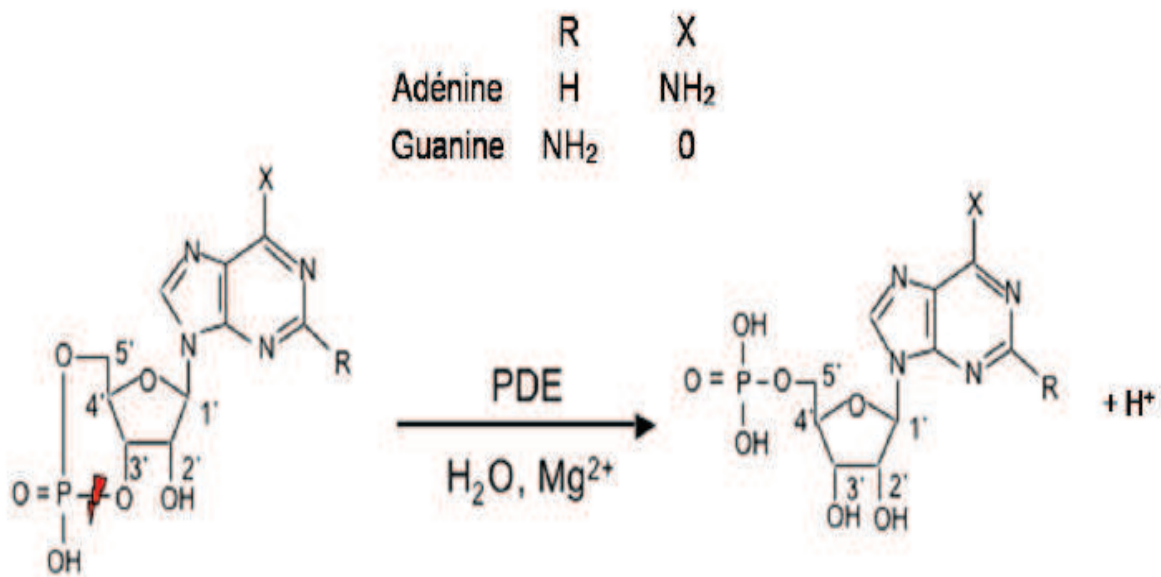


Figure 7: Hydrolyse des nucléotides cycliques par les PDEs. En présence de magnésium et H<sub>2</sub>O, les PDEs dégradent, l'AMPc et/ou le GMPc en AMP5' et GMP5' par coupure de la liaison phosphodiester (Kérais et al, 2005).

#### I.1.2.2.1 La famille des phosphodiésterases de type 1 (PDE1)

Cette famille de PDE dépend pour son activité de la présence du complexe calcium-calmoduline (CaM) dont le site de liaison se situe dans la région régulatrice (domaine N-terminale). Les PDE1 sont stimulées par le complexe Ca/CaM et l'effet activateur du complexe est maximal lorsque 4 ions Ca<sup>2+</sup> se fixent sur la calmoduline (Wang et al., 1980, Sharma et al., 2006). Les PDE1 sont codées par 3 gènes générant plusieurs variants par

épissage alternatif. Elles sont essentiellement cytosoliques et comportent dans leurs structures des sites de phosphorylation pour la PKA (PDE1A1 et PDE1A2) et pour la CaMKinase II (PDE1B1) dont la phosphorylation diminue leur sensibilité à l'activation par la calmoduline (Sonnenburg et al., 1998). Suivant leur gène, les isoformes de PDE1 hydrolysent différemment à la fois le GMPc et l'AMPc. Les PDE1A et 1B hydrolysent préférentiellement le GMPc alors que la PDE1C a la même affinité pour l'AMPc et le GMPc.

**Tableau 2: Affinités des différentes isoformes de PDE1 pour leurs substrats. (Sharma and Kalra, 1994).**

Isozyme	K <sub>m</sub> (μM)		V <sub>max</sub> (μmol/min/mg)	
	cAMP	cGMP	cAMP	cGMP
PDE1B1	12	1,2	10	30
PDE1A2	35	2,7	166	93
PDE1A1	40	3,2	133	44
Lung PDE1	42	2,8	82	47

Tout agent chélatant le Ca<sup>2+</sup> ou inhibant la CaM agit comme un inhibiteur de PDE1. La nimodipine est un dérivé de la dihydropyridine qui antagonise et bloque spécifiquement les canaux calciques de type L et a été décrite comme le premier inhibiteur de PDE1. La Vinpocetine est aussi un inhibiteur spécifique de l'activité basale et activée par la calmoduline de la PDE1 (Zhou et al., 2003). Son effet inhibiteur sur les sous-types de PDE1 est de l'ordre de 8 à 50 μM (CI<sub>50</sub>). La diocléine (CI<sub>50</sub> = 1,44) de même que l'IC224 (CI<sub>50</sub> = 0,08 μM) de la compagnie ICOS corporation inhibent aussi la PDE1 (Gonçalves et al, 2009).

Les PDE1s sont ubiquitaires, on retrouve la PDE1A largement présente dans le cerveau, le sperme, le cœur, le muscle lisse et le poumon et l'artère. La PDE1B est principalement présente dans différents types de cellules neuronales mais également dans les lymphocytes, les macrophages et le muscle lisse. La PDE1C est majoritairement exprimée dans le cerveau et le coeur (Vandeput et al., 2007), et est retrouvée aussi dans le sperme, le muscle lisse en prolifération et l'épithélium olfactif. La PDE1A1 du cœur et la PDE1A2 du cerveau sont phosphorylées par la PKA, tout comme la PDE1C est phosphorylée par la protéine kinase II dépendante de la Ca/CaM. Ces enzymes sont déphosphorylées par la calcineurine, une phosphatase dépendante de la Ca/CaM.

**Tableau 3: Distribution tissulaire et subcellulaire des PDE1 chez les mammifères (Bender and Beavo, 2006).**

<i>Isoformes</i>	<i>Localisation cellulaire /Tissulaire</i>	<i>Localisation intracellulaire</i>
PDE1A	Muscle lisse, cœur, poumon, cerveau, sperme	Prédominance cytosolique
PDE1A1	Cœur, poumon	Prédominance cytosolique
PDE1A2	Cerveau,	Prédominance cytosolique
PDE1B1	Neurones, lymphocytes, muscle lisse, cerveau, muscle squelettique, cœur	Cytosolique
PDE1B2	Macrophages, lymphocytes	Cytosolique
PDE1C	Cerveau, humain muscle lisse en prolifération, spermatides	Cytosolique
PDE1C1	Cerveau, cœur, testicules	-
PDE1C2	Epithélium olfactif	Cytosolique
<b>PDE1C4/5</b>	mRNA présent dans les testicules	-

Dans certaines conditions physiopathologiques, il a été rapporté des dérégulations de PDE1 indiquant leurs implications dans ces maladies. L'expression de la PDE1A est augmentée dans la tolérance aux nitrates au niveau de l'aorte de rat alors que la PDE1A nucléaire est impliquée dans la croissance, la survie des cellules musculaires lisses vasculaires et pourrait contribuer à la formation de la néointima dans l'athérosclérose (Miller et al., 2009). La PDE1B est impliqué dans la fonction locomotrice et est hyper-activée en réponse à des agonistes dopaminergiques (Shimizu et al., 2004; Siuciak et al., 2007). La PDE1C est impliquée dans la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires humaines (Rybalkin et al., 2002). Elle a également été montrée comme étant impliqué dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose.

Tout signal entraînant une augmentation du calcium cytosolique peut potentiellement activer les PDE1s dans les cellules qui les expriment, provoquant une diminution des signaux relayés par l'AMPC et le GMPC. L'entrée continue de calcium, quelque soit son origine, a été montrée comme indispensable à l'activation de la PDE1A (Lapeyre et al., 2004). A l'opposé, la phosphorylation des PDE1s va réduire leur sensibilité au calcium, ce qui va favoriser l'accumulation des nucléotides cycliques et augmenter la durée du signal induit par le calcium.

### I.1.2.2.2 La famille des phosphodiésterases de types 2 (PDE2):

Cette famille a pour substrat le GMPc et l'AMPc avec une faible affinité similaire pour les deux nucléotides et possède la particularité de pouvoir être activée par ces deux substrats. Les PDE2 sont codées par un gène dont les variants ont été identifiées : PDE2A1, PDE2A2 and PDE2A3. Les PDE2 partagent une extrémité C-terminale commune et diffèrent par leur extrémité N-terminale, qui pourrait déterminer leur localisation membranaire ou soluble (Lugnier, 2006). Les PDE2 sont stimulées par le GMPc, en présence duquel, la vitesse de dégradation de l'AMPc est multipliée par 6 (Beavo et al., 1982). Lorsque le GMPc se lie au domaine allostérique GAF-B de la PDE2, il entraîne un changement conformationnel de l'enzyme contribuant à l'augmentation de son activité hydrolytique pour l'AMPc. Le domaine GAF-B possède 30 à 100 fois plus d'affinité pour le GMPc que pour l'AMPc (Bender and Beavo, 2006). Le sodium pourrait par ailleurs inhiber la PDE2 en modulant le fonctionnement des domaines GAF (Cann, 2007).

Elles ont pour inhibiteur spécifique l'erythro-9-(2-hydroxyl-3-nonyl)-adénosine EHNA ; inhibant aussi l'adénosine désaminase. Les analogues du GMPc substitués en position C8 (Br-GMPc) ne stimulent pas les PDE2 et sont capables de mimer le GMPc au niveau du site catalytique en agissant comme un inhibiteur compétitif (Komas et al., 1991).

**Tableau 4: IC<sub>50</sub> des inhibiteurs de PDE2**

<i>Inhibiteurs</i>	<i>IC<sub>50</sub></i>
EHNA	1 µM
Oxindole	40 nM
Bay-60 7550	4,7 nM
PDP	0,6 nM

La PDE2 est principalement présente dans le cœur (Komas et al., 1989; Muller et al., 1992), le cerveau et le foie. Elle est également retrouvée dans les cellules endothéliales (Lugnier and Schini, 1990), les macrophages et les plaquettes.

La PDE2 régule également le courant calcique basal dans les myocytes auriculaires humains (Rivet-Bastide et al., 1997). Elle est impliquée dans l'angiogenèse induite par le VEGF dans les cellules HUVECs (Favot et al., 2004). Elle intervient encore dans la régulation de la perméabilité membranaire des cellules endothéliales (Surapisitchat et al., 2007). En

conditions physiologiques, la PDE2 répond aux concentrations élevées de GMPc (1  $\mu$ M à 5  $\mu$ M) en augmentant l'hydrolyse d'AMPc. Elle intervient dans le retour rapide aux concentrations basales des nucléotides cycliques.

#### **I.1.2.2.3 La famille des PDE3:**

Les PDE3 hydrolysent à la fois le GMPc et l'AMPc avec une grande affinité ( $K_m$  comprises entre 0,1 – 0,8  $\mu$ M). Cependant, elles ont une  $V_{max}$  4 - 10 fois plus élevée pour l'AMPc par rapport au GMPc (Degerman et al., 1997). Les PDE3s sont inhibées par le GMPc qui entre en compétition avec l'AMPc qu'elle hydrolyse. Chez les mammifères, cette famille comprend deux sous-types : La PDE3A et PDE3B. La PDE3A et PDE3B sont activées par la phosphorylation de la Ser/Thr en position 302 (Ser302) par la PKA. L'extrémité C-terminale portant le domaine catalytique contient un insert de 44 acides aminés absents des autres PDEs et qui pourrait jouer un rôle dans la sensibilité des PDE3 au GMPc (He et al., 1998). L'extrémité N-terminale porte des sites de phosphorylation de la PKA et la PKB qui induisent l'activation des PDE3s, et joue un rôle notamment dans la localisation intracellulaire. La PKA et la PKB activent la PDE3A et la PDE3B via la phosphorylation de deux sites différents (P1 et P2). L'inhibition de la PDE3 par le GMPc peut conduire à l'augmentation de l'AMPc et à la vasodilatation (Iugnier et Komasa, 1993) et à l'activation de la fonction cardiaque (Kojda and Kottenberg, 1999). Ce mécanisme intervient dans l'effet stimulant exercé par de faibles concentrations de donneurs de NO ou du GMPc sur les canaux calciques de type L dans les myocytes auriculaires humains. Les PDE3s sont inhibées par la milrinone et le cilostamide (Komasa et al, 1989). La PDE3A est principalement impliquée dans la fonction cardiovasculaire et la fertilité alors que la PDE3B est impliquée dans les phénomènes de lipolyses (Jeon et al., 2005).

**Tableau 5: Localisation subcellulaire des PDE3s (Bender and Beavo, 2006; Jeon et al., 2005, Pauvert et al., 2002).**

	<b>PDE3A</b>	<b>PDE3B</b>
Localisation dans les tissus	<ul style="list-style-type: none"> <li>- cœur</li> <li>- muscle lisse vasculaire</li> <li>- Plaquettes</li> <li>- oocyte</li> <li>- rein</li> <li>- Atère pulmonaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- muscle lisse vasculaire</li> <li>- adipocytes</li> <li>- hépatocytes</li> <li>- rein</li> <li>- <math>\beta</math> cellules</li> <li>- sperme</li> <li>- lymphocytes T</li> <li>- macrophages</li> </ul>
Localisation intracellulaire	- associée à la membrane ou cytosolique	- associée à la membrane de façon prédominante

#### **I.1.2.2.4 La famille des PDE4**

Les PDE4s qui nous intéressent particulièrement dans ce projet de recherche, sont appelées PDE spécifiques de l'AMPC car elles hydrolysent spécifiquement l'AMPC et sont en grande partie responsables de son hydrolyse dans la cellule (McCahill et al., 2008; Srivani et al., 2008; Zhang, 2009).

##### **I.1.2.2.4.1 Structure et activités hydrolytiques des PDE4s**

Les PDE4 sont codées par 4 gènes notés A, B, C et D qui génèrent par épissage alternatif une cinquantaine de sous-types. Elles sont majoritairement présentes dans le cerveau, les cellules de l'inflammation, le tissu cardiovasculaire et les muscles lisses. Les PDE4 sont insensibles au GMPc et spécifiquement inhibées par le Rolipram qui fut conçu comme antidépresseur. Les PDE4s qui hydrolysent spécifiquement l'AMPC avec un  $K_m = 2-4 \mu M$ , contiennent dans leurs structures, des régions appelées « Upstream conserved region ou UCR » situées dans la partie N-terminale. On distingue dans cette famille, des isoformes longues ayant l'UCR1 et UCR2 ; des isoformes courtes ayant seulement l'UCR2 et des isoformes super-courtes ayant seulement une partie de l'UCR2 (forme tronquée). Récemment, il a été décrit une forme encore plus courte appelée « dead-short forme » et qui est dépourvue d'activité enzymatique (Houslay, 2010). Chaque sous famille de PDE4 possède dans sa structure une région catalytique dans la région C-Terminale hautement conservée formée de 17 hélices  $\alpha$  et organisée en 3 domaines. Le site de liaison du substrat contient un site de

liaison  $Zn^{2+}$  et  $Mg^{2+}$  indispensable à l'activité catalytique. La région N-Terminale est codée par 1 ou 2 exons sous le contrôle de promoteurs spécifiques (Conti and Beavo, 2007). Cette région N-Terminale est séquestrée par des protéines partenaires spécifiques.

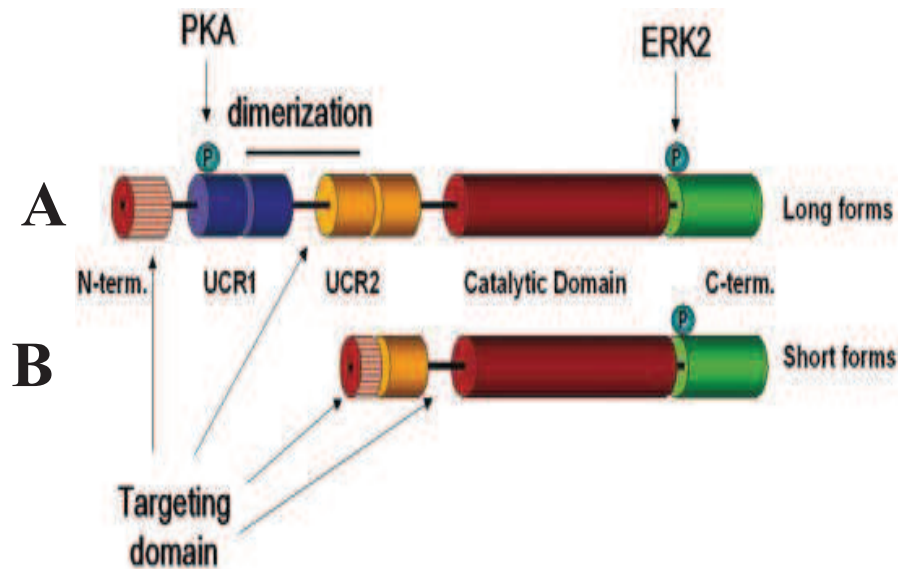


Schéma 4: Structure des différentes isoformes de PDE4. Ce schéma décrit les formes longues (A), les formes courtes (B). Il présente également les sites de phosphorylation de la PKA (activant les formes longues) et des ERK2 (activant les formes courtes et inhibant les formes longues). (Conti, 2003).

#### I.1.2.2.4.2 Compartimentalisation l'AMPC et interactome des PDE4s

La notion de compartimentalisation de l'AMPC a ses origines depuis les années 80 sur les études fonctionnelles montrant les conséquences de l'activation des adénylyl-cyclases dans les cardiomyocytes par la voie des  $\beta$ -adrénergiques et celle des prostaglandines (Hayes et al., 1980). Bien que ces agonistes provoquent une augmentation similaire de l'AMPC intracellulaires, les réponses fonctionnelles sont toutes différentes. La stimulation  $\beta$ -adrénergique provoque un effet inotrope négatif (contraction) avec la phosphorylation de la PKA. Dans les cardiomyocytes la PDE4D8 peut être sélectivement recrutée et interagir avec le récepteur  $\beta_1$ -adrénergique mais pas avec le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique (Richter et al., 2008). Il a été démontré que la PDE4D8 a des interactions spécifiques avec le récepteur  $\beta_1$ -adrénergique et que la PDE4D5 séquestrée par la  $\beta$ -arrestine interagit spécifiquement avec le récepteur  $\beta_2$ -adrénergique du fait de la compartimentalisation de la signalisation par l'AMPC. Les mA-KAP dans le cœur permettent également à la PDE4D d'interagir avec le récepteur de la ryanodine pour réguler avec la PKA la libération de  $Ca^{2+}$ . Des études récentes ont permis de montrer cette compartimentalisation de la signalisation intracellulaire à travers les signalosomes favorisées par les protéines d'ancrage AKAP (McCahill et al, 2008, Baillies,



2009 ; Bajpai et al., 2006) Un signalosome peut regrouper en un complexe : une PDE4, un AKAP, une AC, la PKA ou les Epac (Houslay, 2010). Les mAKAPs séquestrent spécifiquement la PKA grâce à une structure en hélice  $\alpha$ . Par exemple, les AKAP6 séquestrent ensemble les isoformes de PDE4D3 avec la PKA et ERK pour la régulation de l'AMPc local (Dodge-Kafka et al., 2005; Pare et al., 2005).

Bien que les sous types PDE4 hydrolysent de façon identiques l'AMPc avec des valeurs  $K_m$  et  $V_{max}$  similaires, les isoformes particulières ne sont pas redondantes (Lynch et al., 2005). Elles peuvent être associées à différentes structures subcellulaires notamment au noyau (Lugnier et al., 1999). Chaque isoforme particulière est sujette à l'influence de différentes régulations : phosphorylation, ubiquitylation et autres interactions protéiques. Les isoformes de PDE4s sont capables d'interagir avec des effecteurs cellulaires pour réguler finement certaines voies de signalisation. La PDE4D3 est associée à la région sarcomérique via la myomégaline et à la région périnucléaire via les mAKAPs (Dodge et al., 2001), formant un complexe non seulement avec la PKA et la PDE4D3 mais également avec Epac1 et ERK5 (Dodge-Kafka et al., 2005). Les trois enzymes AMPc-dépendantes fonctionnellement distinctes contenues dans ce complexe macromoléculaire (PKA, PDE4D3 et Epac1) répondent à l'AMPc dans différentes gammes de concentrations : la PKA répond à des concentrations de l'ordre du nanomolaire et deviendrait rapidement activée, la PDE4D3 et Epac1 seraient activées directement ou indirectement à des concentrations d'AMPc de l'ordre du micromolaire. Par ailleurs, la phosphorylation de la PDE4D3 par la PKA augmente son affinité et son activité pour l'AMPc alors que sa phosphorylation par ERK5 diminue son activité. Lorsque Epac1 est activée par l'AMPc, elle recrute Rap1 qui supprime l'activation de ERK5 et lève l'inhibition de la PDE4D3. Ce complexe fournit ainsi un contrôle spatial de la PKA par l'ancrage via la mAKAP et un contrôle temporel de la signalisation par l'AMPc via l'activité des PDEs. Ce compartiment de signalisation par l'AMPc dans la région périnucléaire pourrait réguler l'expression de gènes.

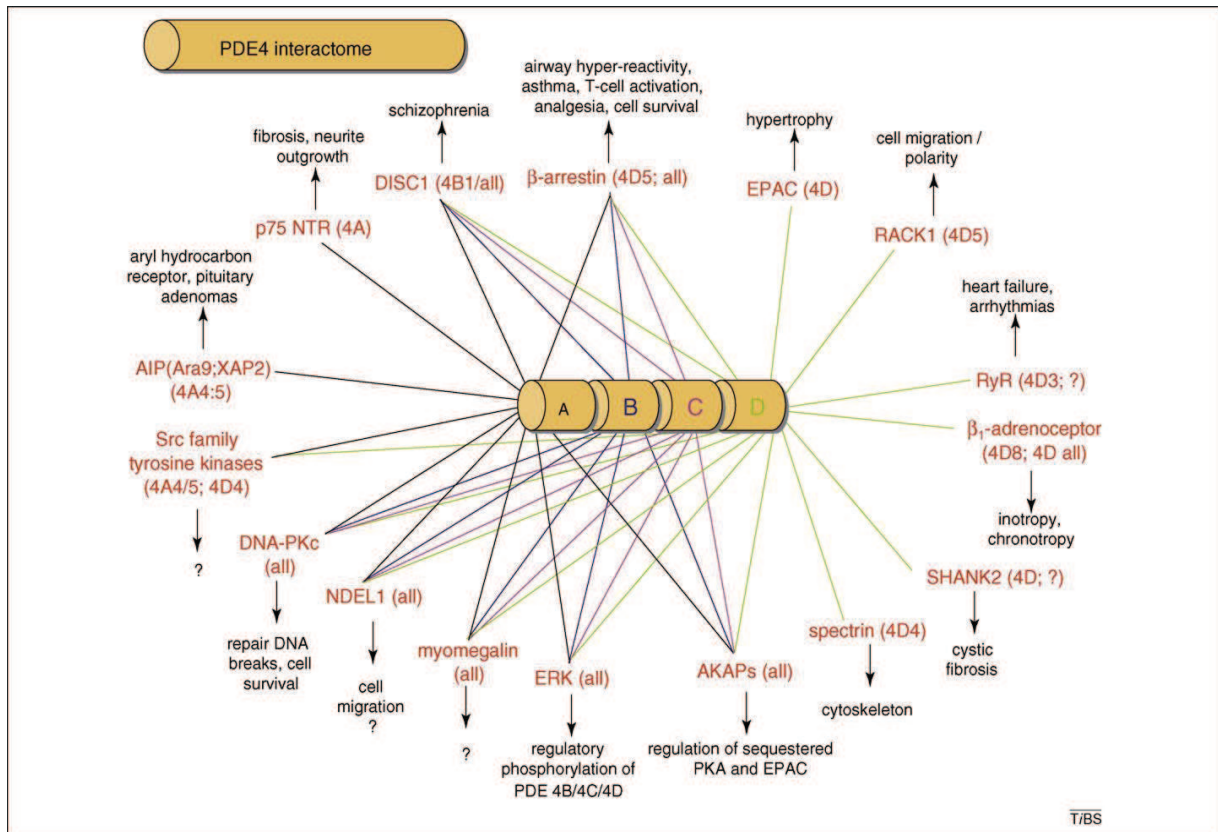


Figure 8. L'interactome des PDE4s. Un certain nombre de protéines sont capables d'interactions directes avec divers isoformes de PDE4 (d'après Houslay, 2010).

#### I.1.2.2.4.3 Inhibition des PDE4s et leurs régulations à court et long terme

La régulation à court terme des PDE4s se fait par la phosphorylation par la PKA tout comme par protéolyse. La phosphorylation par la PKA au niveau de l'UCR1 augmente l'activité catalytique des PDE4s. Dans le cas de l'augmentation prolongée de l'AMPc en réponse à un stimulus hormonal, la phosphorylation dépendante de la PKA permet un mécanisme de feedback aux conditions basales (Cheng et al., 2010 ; Haworth et al., 2010). La phosphorylation par la PKA peut conduire à la dimérisation des isoformes longues de PDE4 et à l'activation de ces dernières. La phosphorylation des PDE4s par les ERK2 (p42 /MAPK) dans la région C terminal active les formes courtes de PDE4D et inhibent les formes longues. Les PDE4s jouent un rôle clef en favorisant la communication croisée entre les voies ERK et la signalisation de l'AMPc (Baillie et al., 2000). Une accumulation prolongée de l'AMPc peut induire une régulation à long terme des PDE4s relative à une induction de nouvelle protéine par synthèse de novo dépendant de la phosphorylation de CREB par la PKA. La diminution de l'expression des isoforms de PDE4A et PDE4B serait associée à une augmentation de l'expression de la PDE4D dans les cellules endothéliales de aorte de bœuf lorsque celles-ci passent du phénotype quiescent au phénotype prolifératif (Keravis et al., 2000, Favot et al., 2004).

La sumoylation est une modification post-traductionnelle aboutissant à la liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO sur une lysine acceptrice d'une protéine cible. Les protéines SUMO (pour Small Ubiquitin-like MOdifier) sont une famille de petites protéines de 12 kDa (ou une centaine d'acides aminés). Récemment, il a été montré que la sumoylation des isoformes longues de PDE4 (4A, 4B) augmente leur activation par la phosphorylation de la PKA et favorise aussi la répression de leur inhibition par la phosphorylation par ERK (Li et al., 2010).

Les inhibiteurs spécifiques de PDE4 ont des puissants effets anti-inflammatoires, ce qui a suggéré l'utilisation de ces composés pour le traitement des maladies inflammatoires comme l'asthme et la BPCO (Houslay et al, 2005, Pagès et al 2009). Ces inhibiteurs sont capables de moduler certaines voies de signalisations impliquées dans l'inflammation comme la p38 MAPK et celle de NF $\kappa$ B (MacKenzie and Houslay, 2000 ; Kwak et al., 2005). Les p38 MAPKs sont membres de la famille MAPK (Mitogen-activated protein (MAP) kinases) qui sont une famille d'enzyme impliquée dans diverses voies de signalisations et activée par une variété de stress environnemental et de cytokines inflammatoires (Morin et al. ; 2005). Après activation des récepteurs, plusieurs cascades de phosphorylations aboutissent à la phosphorylation de la p38 MAPK qui est capable à son tour de phosphoryler IKK $\alpha$ . IKK $\alpha$  phosphoryle I $\kappa$ B $\alpha$ , le represseur de NF $\kappa$ B ce qui aboutit à l'activation de sous-unité p65 de NF $\kappa$ B. NF $\kappa$ B est ensuite transloquée dans le noyau et permet la transcription des gènes qui sont sous son contrôle (IL-1 $\beta$  IL-6, IL-8, COX1/2, TNF $\alpha$ ). I $\kappa$ B $\alpha$  est ubiquitiné et dégradé dans les protoasomes ; ce qui fait que la diminution de sa détection dans la cellule ou dans un tissu est fortement corollée à une inflammation. De même, l'augmentation de la détection de NF $\kappa$ B dans le noyau est au corollée à un processus inflammatoire en cours. Cette voie de signalisation est beaucoup étudiée dans l'inflammation et la phospho-p38 MAPK, I $\kappa$ B et NF $\kappa$ B sont utilisées comme des marqueurs d'inflammation ou leurs voies de signalisations sont explorées pour rechercher les effets anti-inflammatoires d'un composé.

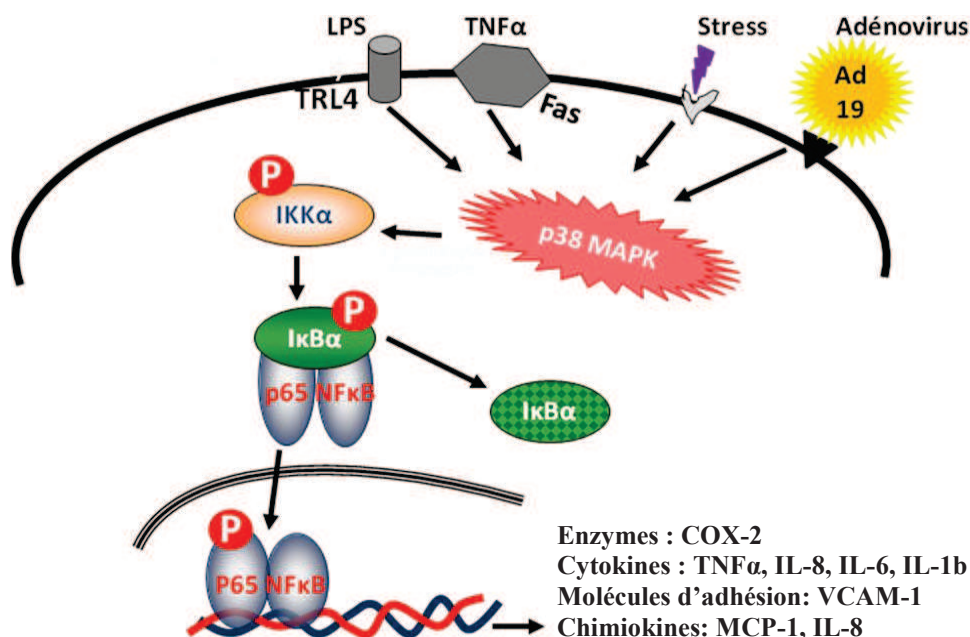


Schéma 5: Activation de la voie p38 MAPK. Plusieurs cascades de phosphorylations aboutissent à la phosphorylation de la p38 MAPK qui est capable à son tour de phosphoryler IKK $\alpha$ . IKK $\alpha$  phosphoryle I $\kappa$ B $\alpha$ , le represser de NF $\kappa$ B ce qui aboutit à l'activation de sous-unité p65 de NF $\kappa$ B. NF $\kappa$ B est ensuite transloquée dans le noyau et permet la transcription des gènes qui sont sous son contrôle (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, COX1/2, TNF $\alpha$ ).

#### I.1.2.2.4.4 Les inhibiteurs de PDE4s en cours de développement

Le premier inhibiteur spécifique de PDE4 a été le rolipram (Lugnier, 1986). Le rolipram se fixe aux PDE4s sur des sites de liaisons ayant deux conformations communément appelées « Low-affinity rolipram binding site » (LARBS) et « High-affinity rolipram binding site » (HARBS). L'effet anti-inflammatoire du rolipram est associé aux LARBS ; alors que la liaison du Rolipram au HARBS est associée à des effets secondaires indésirables comme l'épémétisme ou le vomissement (Zhang et al., 2006; Zhao et al., 2003). L'approche structure-activités a permis la synthèse de plusieurs inhibiteurs de PDE4 de deuxième génération ayant moins d'effets secondaires émétiques. Les plus avancés sont le roflumilast DAXAS® (Boswell-Smith and Spina, 2007) et le cilomilast ARIFLO® (Kroegel and Foerster, 2007) qui sont actuellement en essais cliniques de phase III pour le traitement de la maladie pulmonaire obstructive chronique et de l'asthme. Le roflumilast vient d'obtenir son autorisation de mise sur le marché cette année pour le traitement de la BPCO. (Fabbri et al., 2010). D'autres inhibiteurs de PDE4 sont actuellement développés pour les maladies inflammatoires comme la polyarthrite rhumatoïde, les maladies allergiques de la peau et le psoriasis (Burnouf and Pruniaux, 2002 ; Baumer et al., 2007). La plupart de ces utilisations repose sur la diminution de l'activité de la PDE4 pour réduire les réponses inflammatoires de multiples types cellulaires. Il est bien établi que les inhibiteurs de PDE4 peuvent bloquer la libération de

médiateurs inflammatoires et l'infiltration des cellules immunitaires (Castro et al., 2005), en particulier dans les neutrophiles, les monocytes et sur la fonction lymphocytaire T (Abrahamsen et al., 2004). C'est le cas notamment pour l'arofylline (LAS31025), inhibiteur sélectif de PDE4 à activité anti-inflammatoire (Cooper et al., 1999) évalué dans la dermatite atopique. Enfin, les inhibiteurs de PDE4 suscitent de plus en plus d'intérêt et de développement dans le domaine cérébral (Halene and Siegel, 2008). Ils pourraient augmenter la capacité de mémorisation, autant sur la mémoire de travail que sur la mémoire à long terme (Barad et al., 1998; Gong et al., 2004), ce qui pourrait en faire des traitements efficaces dans la maladie d'Alzheimer. Dans plusieurs modèles animaux, les inhibiteurs de PDE4s ont montré des effets bénéfiques contre la progression de maladies autoimmunes (Shenoy and Agarwal, 2010).

**Tableau 6 : Les inhibiteurs de PDEs dans le traitement de maladies autoimmunes.**

Maladies	Modèle animal	inhibiteurs PDE	Effets bénéfiques
Multiple sclerosis	EAE	Rolipram	Prévient la mise en place ↓ sévérités des symptômes ↓ MRI et sévérité histologique ↓ Th1 cytokines sans affecter les Th2
		Pentoxifylline, Ibudilast	Améliore l' EAE
Arthritis	CIA	YM-393059 Inhibiteur de PDE4	↓ Sévérité des arthrites ↓ anticorps anti-collagène ↓ TNF $\alpha$ et IFN $\gamma$
	SCW	Rolipram	↓ Sévérité des arthrites ↓ migration des Neutrophiles
	AIA	Rolipram	similaires au Methotrexate aux phases précoces
Uveitis	uveites induites par le LPS	Rolipram	↓ Sévérité des uveites ↓ E-selectine intra-oculaire, TNF- $\alpha$ et IL-6
PAH	PAH induite par la Monocrotaline	Sildenafil	Prévient le remodelage
IgA nephropathy	anticorps Anti-Thy1	Vardenafil	↓ MC prolifération et accumulation matricielle ↓ TGF- $\beta$ -signalling
Scleroderma and IPF	IPF Bleomycine	Sildenafil	↓ fibrose pulmonaire et l'hypertrophie améliore la survie

Abbreviations: EAE: "Experimental Autoimmune Encephalomyelitis", CIA: "collagen induced arthritis"; SCW: streptococcal cell walls (SCW) induced arthritis; AIA: antigen-induced arthritis; PAH: pulmonary artery hypertension; MCP: Monocyte Chemotactic Protein-1; ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule-1; MPGN: Mesangial Proliferative Glomerulonephritis; CKD: Chronic Kidney Disease; IPF: Idiopathic Pulmonary Fibrosis; RV: right ventricle (Shenoy and Agarwal, 2010).

#### **I.1.2.2.5 Les familles de PDE5**

Cette famille de PDE hydrolyse spécifiquement le GMPc et est phosphorylée par la PKA et KG. La PDE5 est inhibée par le zaprinast, le DMPP0 et le sildénafil qui est bien connu sous le nom de viagra. Le Viagra<sup>®</sup> est un puissant inhibiteur de PDE5 qui est utilisé en ce moment en thérapeutique pour la correction des troubles d'érection masculine. De même le sildénafil a montré un effet hypotenseur et est développé contre l'hypertension pulmonaire (Pauvert O et al ; 2003, 2004). La présence de la PDE5 dans les myocytes cardiaques a été démontrée récemment, à la fois au niveau des ARNms et au niveau des protéines. Il a été montré que l'inhibition de la PDE5 provoque une diminution de la stimulation  $\beta$ -adrénergique de la contractilité cardiaque (Borlaug et al., 2005) et de  $I_{Ca,L}$  (Ziolo et al., 2003). Dans les myocytes ventriculaires de souris, le sildénafil inhibe l'apoptose et aurait un effet cardioprotecteur. De plus, l'exposition chronique au sildénafil empêche ou reverse l'hypertrophie cardiaque chez la souris (Koitabashi et al., 2010). La PDE5 a également contribuerait à la compartimentalisation intracellulaire du GMPc dans les myocytes cardiaques. La PDE5 exerce un contrôle spatiotemporel sur le pool intracellulaire de GMPc généré par sGC mais pas sur celui généré par pGC, qui est sous le contrôle de la PDE2 (Castro et al., 2006). Par ailleurs, il a été montré que la PDE5A était couplée à la eNOS dans le coeur (Koitabashi et al., 2010). Ce couplage confère à la PDE5A une localisation au niveau des bandes Z et un rôle régulateur du GMPc synthétisé après activation de la eNOS suite à une stimulation  $\beta$ -adrénergique. En absence de eNOS, la PDE5A n'est plus associée aux bandes Z et le signal GMPc n'assure plus la régulation de la stimulation  $\beta$ -adrénergique.

#### **I.1.2.2.6 Les familles de PDE6 à PDE11**

Les cinq autres familles de PDE (PDE6- PDE11) font l'objet d'importantes recherches ces dernières années en vue de déterminer leurs implications dans différentes pathologies.

Les PDE6 hydrolysent le GMPc et sont spécifiques de la rétine. Elles sont plus connues sous le nom de phosphodiésterases des photorécepteurs (Coquil et al., 1975). Elles sont aussi présente dans la glande pinéale (Morin et al., 2001). La famille des PDE7s est issue de 2 gènes (PDE7A et PDE7B).

Les PDE7s hydrolysent spécifiquement l'AMPc et sont insensibles au GMPc et au rolipram. Contrairement aux autres PDEs, les PDE7s ne possèdent pas de domaines régulateurs sur leur extrémité N-terminale mais portent des sites de phosphorylation par la PKA. Leur affinité pour l'AMPc est élevée alors que leur vitesse maximale d'hydrolyse est



faible, ce qui laisse penser qu'elles joueraient un rôle dans la régulation basale des concentrations d'AMPc (Lugnier, 2006).

La famille des PDE8 hydrolyse spécifiquement l'AMPc. Comparativement aux PDE4, l'affinité des PDE8s pour l'AMPc est 40 fois supérieure mais leur  $V_{\max}$  est 10 à 100 fois inférieure (Fisher et al., 1998a). Elle est insensible au rolipram et à l'IBMX.

La famille des PDE9s est l'une des familles les plus récemment découvertes. C'est la famille ayant la plus grande affinité pour le GMPc (Fisher et al., 1998b). Elle est insensible à l'IBMX.

Les PDE10 hydrolysent l'AMPc et le GMPc. Elles ont une meilleure affinité pour l'AMPc mais dégradent le GMPc 2 à 5 fois plus vite, à l'opposé des PDE3s (Fujishige et al., 1999). C'est pour cela qu'elles sont inhibables par l'AMPc. Leur extrémité N-terminale porte 2 domaines GAF liant l'AMPc plutôt que le GMPc (Gross-Langenhoff et al., 2006). A ce jour, il n'existe qu'un seul gène dans cette famille, la PDE10A, donnant 4 variants.

La famille des PDE11s est la plus récente puisqu'elle a été découverte en 2000 (Fawcett et al., 2000). Elle est issue d'un seul gène, PDE11A, donnant 4 variants identifiés. La PDE11A hydrolyse avec une affinité analogue l'AMPc et le GMPc.

## **I.2 Généralités sur l'inflammation chronique**

L'inflammation est une partie d'une réponse biologique complexe de tissus vivants et vascularisés à une agression ; qui peut être d'origine physique (le chaud, le froid, les radiations ionisantes), chimique (acides ou basiques, des toxines bactériennes) et infectieuse (microorganisme). L'inflammation (du latin « inflammare » signifie enflammer) est la réaction immunitaire stéréotypée qui est rapidement mise en place pour contrôler l'agression (Ferrero-Miliani et al., 2007). Elle peut être alors la conséquence d'une infection (bactéries, virus, parasites ou champignons) ou d'une nécrose tissulaire. Elle se manifeste par quatre signes principaux qui sont : la rougeur, la chaleur, la tuméfaction (gonflement) et la douleur. Le mécanisme inflammatoire fait intervenir un grand nombre de substances présentes dans le sang, entre autres des neurotransmetteurs (prostaglandines, histamine), des composantes du complément et des cytokines. Les cellules impliquées dans l'inflammation se composent des lymphocytes, les cellules phagocytaires (les polynucléaires neutrophiles et les macrophages), les mastocytes et les polynucléaires basophiles et les fibroblastes. L'inflammation est une réaction bénéfique pour l'organisme ; elle participe à la cicatrisation et à la clairance des microorganismes infectieux. L'inflammation aiguë est la réponse initiale de l'organisme à un

stimulus et conduisant à une augmentation du mouvement plasmatique et cellulaire (leucocytes) vers le tissu endommagé. L'inflammation chronique est caractérisée par les types cellulaires impliqués, la durée et l'amplitude de la réaction immunitaire pouvant conduire à des conséquences néfastes. En cas de réaction importante de l'organisme face à l'agression, interviennent les corticostéroïdes qui permettront d'arrêter le processus inflammatoire. Ces hormones ont une activité immunosuppressive (Rhen and Cidlowski, 2005) permettant de supprimer de nombreuses fonctions des cellules de l'inflammation : 1) l'activation des cellules T régulatrices pour stopper la réponse immunitaire en cours ; 2) l'inhibition de la dégranulation des mastocytes et des polynucléaires basophiles et éosinophiles ; 3) l'inhibition de la migration des polynucléaires neutrophiles et des monocytes vers les sites inflammatoires (Barczyk et al., 2010). Dans bien de cas, cette barrière est franchie et l'organisme ne peut pas contrôler l'inflammation. Il devient nécessaire d'aider passagèrement l'organisme en donnant au patient des molécules chimiques dérivées des corticoïdes (cortisones) ou des inhibiteurs de cyclooxygénases. Ces deux familles de molécules inhibent la cascade de réactions biochimiques concourant à la production de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique ou d'autres médiateurs lipidiques de l'inflammation comme les leucotriènes et le thromboxane A<sub>2</sub> (Moncada et al., 1975). Dans le cas d'inflammation aiguë, les glucocorticoïdes connus sous le nom d'anti-inflammatoires stéroïdiens et les inhibiteurs de cyclooxygénases (COX-1 et COX-2) ou anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) ont des effets analgésiques, antipyrétiques et anti-inflammatoires. Plus récemment, les inhibiteurs de phosphodiésterases qui sont des enzymes majoritairement exprimés dans les leucocytes ont été identifiées comme de puissants anti-inflammatoires (McCann et al., 2010 ; Wang et al., 2010).

Bien que bénéfique pour le maintien de l'intégrité de l'organisme, l'inflammation aiguë ou chronique peut avoir des conséquences physiopathologies néfastes causant des dommages tissulaires à long terme. C'est ainsi que l'inflammation chronique est un processus délétère qui survient dans de nombreuses pathologies connues sous le nom de maladies inflammatoires chroniques. Quatre grands ensembles de pathologies sont en têtes de liste dont : les maladies chroniques de l'intestin (maladie de Crohn), les maladies auto-immunes (lupus), les affections pulmonaires récurrentes (l'asthme) et les maladies inflammatoires des os (Van Assche et al., 2009). Le dénominateur commun de ces pathologies est l'inflammation disproportionnée qui conduit fatalement à la nécrose tissulaire et à la perte de certaines grandes fonctions de l'organisme. Ces pathologies sont traitées par des anti-inflammatoires, mais aussi par des agents bloquant les récepteurs (des récepteurs, des cytokines et des interleukines pro



inflammatoires) et les cellules de l'inflammation comme : les anticorps anti-TNF $\alpha$ , anti- CD 20, anti- IL-1 , anti-IL-6 etc...(Barnabe et al., 2010; Tanaka et al., 2010). Malgré l'amélioration du pronostic vital par ces traitements symptomatiques, les maladies inflammatoires chroniques continuent d'inflencer significativement sur la morbidité des patients à l'échelle mondiale. Ces maladies augmentent en prévalence, coût, et sévérité (Hutchinson et al., 2010; Wedzicha and Donaldson, 2003). Une personne sur sept au Royaume-Uni est touchée par une maladie pulmonaire chronique qui est le plus souvent la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC) ou l'asthme. Approximativement 2,7 millions de décès ont été causés par la BPCO en 2000 dans le monde, dont la moitié concerne la région Est du Pacifique (Chine). La BPCO cause 400 000 décès par an dans les pays industrialisés. La prévalence de la BPCO chez l'adulte est de 0,5 % en Afrique et entre 3–4 % en Amérique du Nord (Lopez and Mathers, 2006; Lopez et al., 2006a; Lopez et al., 2006b).

Au cours de mes travaux de recherche doctoral, je me suis intéressé à deux maladies inflammatoires chroniques à savoir : le lupus érythémateux disséminé qui est une maladie auto-immune et aussi à l'asthme qui est une affection pulmonaire due à l'inflammation. Ces deux pathologies sont la conséquence de la dérégulation ou à proprement parlé de la réaction inappropriée du système immunitaire face au danger. Ce qui provoque dans le cas du lupus une tolérance de l'immunité et dans l'asthme à une hypersensibilité de type retardé. Dans les prochains chapitres, nous décrivons la physiopathologie du Lupus et de l'asthme afin de dégager de nouvelles cibles moléculaires pouvant potentiellement permettre de traiter ces maladies.

## **I.2.1 Revue de la littérature sur 2 modèles d'inflammations chroniques**

### **I.2.1.1 Le lupus érythémateux disséminé (LED)**

#### **I.2.1.1.1 Manifestations cliniques du LED**

Le lupus érythémateux disséminé est un prototype de maladie auto-immune caractérisée par la présence d'un large spectre d'anticorps auto-immuns associés à une diversité de manifestations cliniques (Ghirardello et al., 2001; Shoenfeld, 2007). Le lupus peut atteindre différents organes du corps et présente un grand polymorphisme clinique. Les glomérulonéphrites, les polyarthrites, les troubles neuropsychiatriques et les dermatites sont les manifestations cliniques les plus fréquentes chez ces patients. Selon le Comité du Collège Américain de Rhumatologie (ACR) les syndromes neuropsychiatriques du lupus incluent les dysfonctions cognitives, les hallucinations, l'anxiété, les troubles de l'humeur, et les psychoses (de Carvalho et al., 2010 ; Sanna et al., 2003). Les troubles cognitifs les plus sévères sont souvent associés à la présence d'anticorps anti-phospholipides (Fong and Thumboo, 2010). Le lupus reste une particularité parmi les maladies auto-immunes par sa susceptibilité à produire une diversité d'auto-anticorps. On estime de nos jours à plus de 116 anticorps induits au cours du lupus, dont 20 sont impliqués dans les troubles neuropsychiatriques. Le lupus cutané est la seconde manifestation clinique du LED dont les lésions cutanées sont appelées érythèmes. L'érythème maculo-facial est caractéristique du lupus et son aspect en forme de « loup voilé » a donné à cette maladie le nom de lupus érythémateux. Plus tard il a été appelé lupus érythémateux disséminé du fait qu'il atteignait toutes les parties du corps. Les glomérulonéphrites et complications rénales observées au cours du lupus sont la conséquence du dépôt de complexes immuns dans le néphron (Sule et al., 2010). Les cibles nucléaires des cytokines, les anticorps et les infiltrations cellulaires macrophagiques sont les causes de dommage tissulaire modifiant la morphologie et la fonction rénale (Bagavant and Fu, 2009). En plus de ces constats, la chimiothérapie lourde fragilise l'état du patient en l'exposant à des insuffisances rénales sévères. Comme toute maladie auto-immune, les arthrites sont rencontrées dans le lupus (Kamen and Alele, 2010).

### **I.2.1.1.2 Physiopathologie du lupus**

Le LED est une maladie auto-immune, inflammatoire et chronique caractérisée par la production d'anticorps dirigés contre le compartiment nucléaire : les splicéosomes, l'ADN, et les phospholipides (Smyth et al., 2010; Urbanus et al., 2009). La plus grande incidence est observée chez les femmes (9/10 des patients) en âges de pré-ménopause (20- 50 ans) avec une prévalence plus élevée dans la population noire. En Amérique du nord et en Europe du nord, elle atteint 40-100000 personnes par an. La maladie lupique présente un grand polymorphisme clinique et sa pathogénicité reste encore mal connue. Différents facteurs interagissant entre eux permettent d'expliquer la physiopathologie du lupus. A l'heure actuelle, on pense que le lupus est une maladie d'origine immunologique, hormonale, génétique et environnementale (Al Arfaj and Khalil, 2009; Cooper et al., 2010; Cunningham and Gilkeson, 2010; Zsilak et al., 2005).

Le rôle endogène des œstrogènes et androgènes dans le développement du LED a été suggéré du fait du sex-ratio de 9/1 en faveur des femmes, mais aussi confirmé par des études expérimentales dans des modèles animaux (Feng et al, 2010). Les œstrogènes agirait sur leur récepteur en augmentant l'activation des cellules T chez les femmes lupiques ; avec amplification des interactions entre les lymphocytes T et B, puis une activation des cellules B à produire des anticorps (Rider and Abdou, 2001). Le blocage de la synthèse de l'œstrogène par un inhibiteur d'aromatase, la 4-hydroxyandrostendione améliore le lupus néphrétique chez la souris lupique MRL/lpr (Greenstein et al., 1993). En étudiant la relation hormone sexuelle et réponse immune, Ahmed SA, Verthelyi D. ont observé une exacerbation du lupus par les œstrogènes et une amélioration de la maladie par les androgènes (Ahmed and Verthelyi, 1993).

Chez les femmes les réactions immunitaires sont plus fortes. Ainsi, des lymphocytes et des monocytes provenant de femmes ont démontré une activité présentatrice d'antigène élevée ainsi qu'une forte réponse mitogénique. Les hormones sexuelles féminines comme l'œstrogène et la prolactine sont des immuomodulateurs impliqués dans l'auto-immunité (Chavez-Rueda et al., 2005; Gonzalez et al., 2010). Le rôle des hormones sexuelles dans la pathogénicité du LED a aussi été élucidé par des études moléculaires, expérimentales et cliniques (Gonzalez et al., 2010; Shen et al., 2010). La prolactine comme les œstrogènes affectent la maturation et la sélection de cellules B autoréactives ainsi que la sécrétion d'anticorps contrairement aux progestérones qui sont immunosuppressives (Khan et al., 2010). La génération F1 de souris femelles NZB x NZW, un modèle lupique murin développe

précocement la maladie et a une courte survie comparé aux mâles de même génération. Le traitement des souris lupiques par les œstrogènes ou la prolactine exacerbe la maladie et précipite à la mort. L'inhibiteur spécifique des récepteurs d'œstrogènes, le tamoxifène améliore la morbidité de la maladie avec une réduction des anticorps IgG3. Le traitement avec raloxifène augmente également la survie chez la souris MRL/lpr (Zhang et al. 2010). Le LED se développe à un âge précoce dans la population noire comparativement à la population blanche ; avec une forte présence d'anticorps anti-ribonucléoprotéine (anti-RNP) qui ont une prédilection pour des structures telles les glomérules, le mésengium. De ce fait ces patients sont le plus souvent susceptibles aux néphrites et aux insuffisances rénales (Webb et al., 2010). Les haplotypes HLA-DR2 et DQ6 sont associés à une augmentation des anticorps anti-phospholipides qui ciblent les tissus entraînant leur dommage à long terme (Arnett et al., 1996; Paisansinsup et al., 2002).

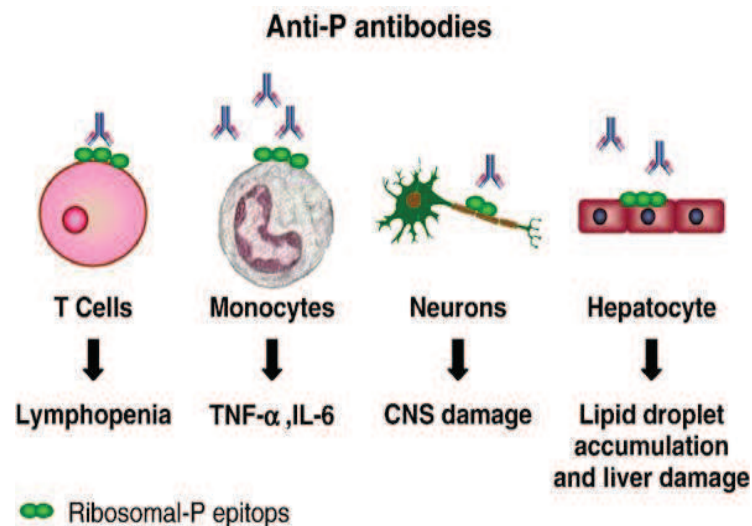


Schéma 6: La physiopathologie des anticorps anti-phospholipides. Les anticorps anti-phospholipides (Anti-P) sont reconnus par les lymphocytes T. L'hyper-activation des lymphocytes T par les anti-P conduit à une baisse d'IL-2 et de la prolifération (lymphopénie). En activant les macrophages, les anticorps anti-P provoquent une forte sécrétion de TNF $\alpha$  et d'IL-6. La fixation des anti-P au niveau des neurones provoque des dommages tissulaires et dans des troubles au niveau des hépatocytes (Toubi and Shoenfeld, 2007).

Les autres facteurs environnementaux ou médicaux augmentant le risque du LED sont liés aux traitements : hormonothérapie par les estrogènes et les contraceptifs oraux, à l'exposition aux polluants plastiques aux surfactants, aux pesticides, aux produits chimiques industriels (bisphénol, phthalates), aux phytoestrogènes (génisteine, coumesterol et mycoestrogènes, zéaralenone) (Hewagama and Richardson, 2009).

Du point de vue cellulaire et moléculaire, le LED est caractérisé par des altérations de certaines voies de signalisations cellulaires conduisant à une dérégulation du système

immunitaire. Ainsi au niveau de cellules clefs de l'immunité comme les lymphocytes T, un mécanisme d'activation anormal a été mis en évidence, notamment un faible seuil d'excitation conduisant à un taux de calcium intracellulaire élevé (Nicolaou et al., 2007; Zielinski et al., 2005) avec phosphorylation des protéines impliquées dans la voie TCR/ CD3 (Blasini et al., 1998; Grolleau et al., 2000). Chez 80 % des patients LED, l'absence de la molécule CD3 $\zeta$  qui se trouve remplacée par le fragment du récepteur (FcR)  $\gamma$  est constaté. Ainsi (FcR) $\gamma$  qui est normalement associé à la kinase syk, membre de la familles des tyrosines kinases (absente dans le lymphocyte T anormal) augmente de 100 fois la concentration du calcium intracellulaire (Ciszak et al., 2007; Krishnan et al., 2008). L'élévation de l'activité de la caspase-3 hydrolysant le CD3 $\zeta$  contribue fortement à l'altération de la transduction du signal du TCR/CD3 (Crispin et al., 2007; Tsuzaka et al., 2006).

Ceci conduit à l'hyperactivation du lymphocyte T qui est à l'origine de la baisse de production d'interleukine-2 (IL-2) et de la prolifération cellulaire qui sont toutes deux les causes de la maladie auto-immune (Lieberman and Tsokos). Les lymphocytes T hyperactifs activent à leurs tours les cellules B autoréactives à produire des auto-anticorps et les macrophages à sécréter une forte quantité de TNF $\alpha$ . De plus, les anomalies morphologiques et membranaires des cellules T contribuent à l'augmentation de leur capacité de migration. Chez le lymphocyte B, la surproduction d'IL-10 provoque une forte sécrétion anticorps anti-ADN (Reynolds et al., 2009). Le splicéosome, une particule composée d'un ARN U et de protéines, est l'une des nombreuses cibles moléculaires reconnues par les anticorps et les cellules T dans le lupus. Monneaux et Muller ont montré que le peptide phosphorylé en position 140 (peptide 140) de la protéine U1-70K du splicéosome avait des propriétés tolérogènes chez les souris lupiques et était reconnu par les anticorps et les cellules T CD4<sup>+</sup> de patients lupiques (Monneaux et al., 2004). Les schémas suivants récapitulent la signalisation TCR/CD<sub>3</sub> dans les lymphocytes normaux et au cours du lupus.

La liaison du complexe TCR/BCR par l'antigène D (AgD) par ou l'anticorps-récepteur cause la phosphorylation de l'AgD. Ce complexe devient le site d'ancrage des protéines membre de la famille des « Protein Tyrosines Kinases » PTKs de Src ou Syk conduisant à leur activation et l'amplification de la production de phosphotyrosines. Ceci conduit à la production de diacylglycerol et d'InsP<sub>3</sub> par la PLC $\gamma$  phosphorylée. La liaison de l'InsP<sub>3</sub> à son récepteur localisé dans le reticulum endoplasmique provoque la libération du Ca<sup>2+</sup>. Le Ca<sup>2+</sup> a son tour active la serine phosphatase de la calcineurine, qui déphosphoryle la forme cytoplasmique (phosphorylée) du facteur de transcription NFAT. NFAT

déphosphorylée migre rapidement dans le noyau et avec l'aide d'autres facteurs de transcription initie la transcription des gènes précoces de la réponse immune.

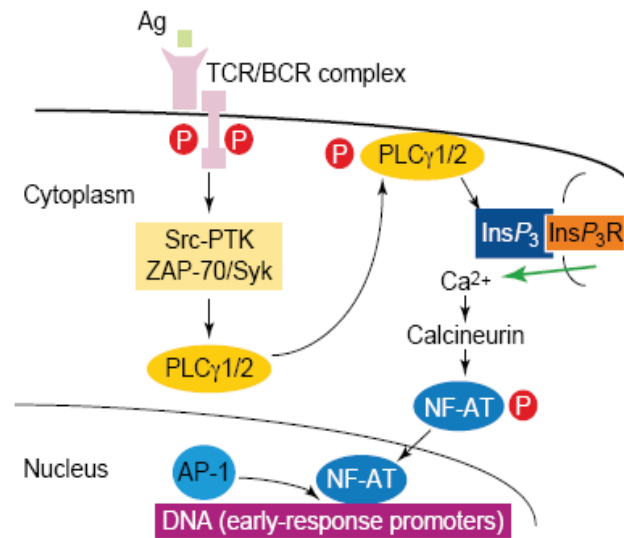


Figure 9. La signalisation par le complexe TCR/BCR dans les lymphocytes normaux. Abbreviations: Ag, antigen; AP-1, activating protein 1; BCR, B-cell receptor; InsP3R, 1,4,5-inositol trisphosphate receptor; NFAT, nuclear factor of activated T cells; P, phosphate group; PLCγ1/2, phospholipase Cγ isozyme 1 or 2; PTK, protein tyrosine kinase; TCR, T-cell receptor (Crispin et al., 2007).

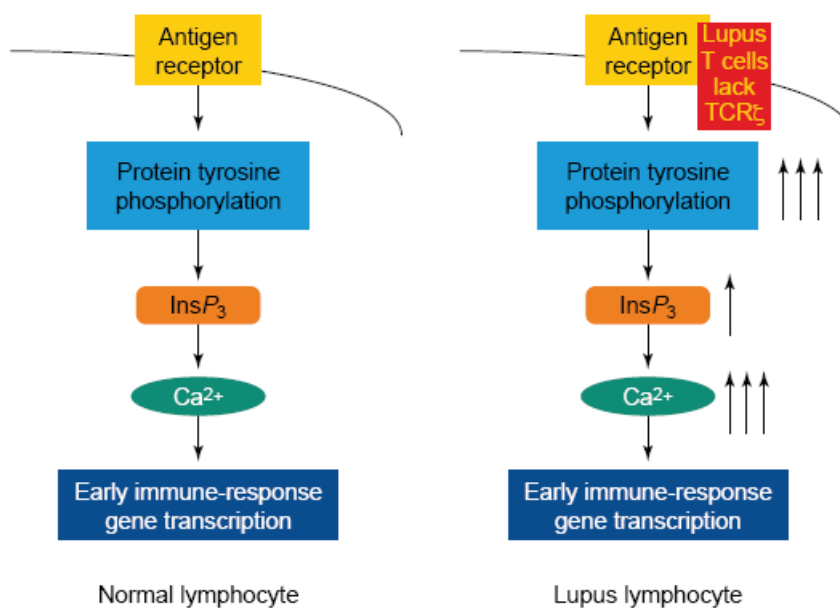


Figure 10. Différences quantitatives dans la cascade de signalisation régulée par le TCR ou le BCR entre des lymphocytes normaux et lupiques. La signalisation régulée par les anticorps anti-récepteurs résulte en une forte production de protéines cytosoliques phosphorylées suivi d'une libération d'insP<sub>3</sub> importante et une forte libération de Ca<sup>2+</sup> dans la cellule. Dans le lupus la signalisation régulée par le TCR/CD<sub>3</sub> est assurée en l'absence de TCRζ. Abréviations: BCR, B-cell receptor; InsP<sub>3</sub>, 1,4,5-inositol trisphosphate; NFAT, nuclear factor of activated T cells (Crispin et al., 2007).



Le lupus néphrétique reste de loin la manifestation commune la plus sévère, caractérisée par le dépôt de complexes immuns dans le rein. L'insuffisance rénale représente le stade le plus ultime du LED, assombrissant le pronostic vital du patient. Au regard de l'importance de l'atteinte rénale au cours du lupus, nous décrivons l'anatomie et la fonction urinaire pour mieux comprendre la physiopathologie de la glomérulonéphrite au cours du lupus.

### **I.2.1.2 Anatomie fonctionnelle et physiologie du système urinaire**

Chaque jour les reins filtrent à peu près 200 L de plasma ; excrètent des substances toxiques, divers déchets métaboliques (urée, les ions en excès) et ramènent dans le sang les substances nécessaires au fonctionnement de l'organisme (Marieb, 2010). Les reins jouent donc un rôle d'épuration et d'excrétion des déchets. Ils participent également à la régulation du volume (équilibre osmotique) et de la composition chimique (équilibre acido- basique) du sang. En plus de ces fonctions, les reins participent à la néoglucogenèse durant le jeûne prolongé, produisent des hormones (rénine, et érythropoïétine) et transforment la vitamine D sous sa forme active.

Le néphron est l'unité structurelle et fonctionnelle du rein qui en compte environ 1 million. Le néphron est l'unité de filtration du sang où se forme l'urine. Il se compose d'un corpuscule rénal constitué de capsule glomérulaire entourant le glomérule et d'un tube rénal. La capsule glomérulaire est composée : l'épithélium fenestré qui est un feuillet pariétal formé d'épithélium simple squameux et de feuillet viscéral composé de cellules épithéliales modifiées et ramifiées appelées podocytes (Marieb, 2010).

L'élaboration de l'urine et l'ajustement simultanée de la composition du sang se divisent essentiellement en trois étapes : la filtration glomérulaire qui s'effectue dans les glomérules, puis la réabsorption tubulaire et l'excrétion tubulaire s'effectuant dans les tubules.

La première étape qui est la filtration glomérulaire est un processus, passif et non sélectif, au cours duquel les liquides et les solutés sont poussés à travers l'endothélium fenestré par la pression hydrostatique. Les glomérules se comportent comme de simples filtres mécaniques. Les molécules de tailles inférieures à 3 Å présentes dans le sang comme l'eau, le glucose, les acides aminés et les déchets azotés traversent librement la membrane de filtration vers le tube rénal. Les protéines plasmatiques telles que l'albumine engendrent dans le capillaire glomérulaire une pression osmotique appelée pression oncotique suffisante pour empêcher l'eau du plasma de filtrer totalement dans la chambre glomérulaire. La présence de protéines ou de cellules sanguines dans l'urine traduit une atteinte de la membrane de filtration.

Le filtrat est récupéré et renvoyé dans le sang par les tubules rénaux. Cette récupération encore appelée réabsorption tubulaire qui est la deuxième étape de l'élaboration de l'urine, est un mécanisme de transport transépithélial. Les reins sains absorbent complètement ou presque tous les nutriments organiques (glucoses et les acides aminés) afin de maintenir ou rétablir les concentrations plasmatiques normales. Par ailleurs, le rein ajuste la réabsorption de l'eau et des ions en réaction à des signaux hormonaux. La réabsorption du sodium est toujours active et se fait contre le gradient de concentration par la pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase nécessitant une consommation d'énergie (ATP). La réabsorption du  $\text{Na}^+$  par transport actif primaire fournit l'énergie et les moyens nécessaires à la réabsorption de la plupart des autres solutés. La réabsorption de l'eau et des nutriments se fait d'abord par diffusion passive (diffusion facilitée et osmose) où les substances passent du milieu le plus concentré au milieu le moins concentré. En passant des cellules tubulaires au sang du capillaire péri-tubulaire, les ions  $\text{Na}^+$  chargés positivement instaurent un gradient électrique qui favorise la diffusion des anions  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{Cl}^-$ . L'eau suit fatalement le sodium et cette réabsorption est appelée réabsorption obligatoire de l'eau. A mesure que l'eau sort des tubules, la concentration des solutés dans le filtrat augmente considérablement. Ce phénomène de diffusion est à l'origine de la réabsorption passive d'un certain nombre de solutés (cations, acides gras et en partie l'urée) présents dans le filtrat. Il explique aussi pourquoi les médicaments liposolubles et les toxines environnementales sont difficiles à être excrétés dans l'urine.

La troisième étape de l'élaboration de l'urine qui est la sécrétion tubulaire (en quelque sorte l'inverse de la réabsorption tubulaire) a pour fonction : 1) d'éliminer des substances ne se trouvant pas dans le filtrat (médicament) ; 2) éliminer les substances nuisibles ou métabolites finaux (urée, acide urique), 3) débarrasser le  $\text{K}^+$  en excès et régler le pH sanguin (Marieb, 2010). Presque tous les ions  $\text{K}^+$  contenus dans l'urine sont activement sécrétés dans la dernière partie du tube contourné distal par les cellules principales et dans le tubule rénal collecteur sous l'influence de l'aldostérone. Quand le pH sanguin diminue, les cellules intercalaires du tube contourné distal TCD et celles du tubule rénal sécrètent activement des ions  $\text{H}^+$  dans le filtrat et elles retiennent plus d'ions  $\text{HCO}_3^-$  et  $\text{K}^+$  qu'à l'ordinaire. Inversement quand le pH sanguin s'élève, les cellules tubulaires réabsorbent des ions  $\text{Cl}^-$  plutôt que des ions  $\text{HCO}_3^-$  et les ions  $\text{H}^+$  sont réabsorbés. L'une des fonctions capitales du rein est de maintenir la concentration des solutés dans les liquides de l'organisme autour de 300 mmol/kg, soit la concentration osmotique du plasma sanguin, en réglant la concentration et le volume de l'urine. Quand la neuro-hypophyse ne sécrète pas d'hormone antidiurétique, les tubes rénaux collecteurs demeurent essentiellement imperméables à l'eau. L'urine est alors

diluée et peut atteindre des valeurs aussi faibles que 50 mmol/kg. Sous l'action de l'hormone antidiurétique, la diurèse est inhibée. Par l'intermédiaire de l'AMPc, cette hormone augmente le nombre des canaux à eau situés dans les cellules principales des tubules rénaux collecteurs permettant la rétention de l'eau et la concentration de l'urine. Tout phénomène qui occasionne une perte d'eau augmente l'osmolarité plasmatique au dessus de 300 mmol/kg (diarrhée, l'hypovolémie et l'hypertension). Ce qui entraîne l'augmentation de l'hormone antidiurétique.

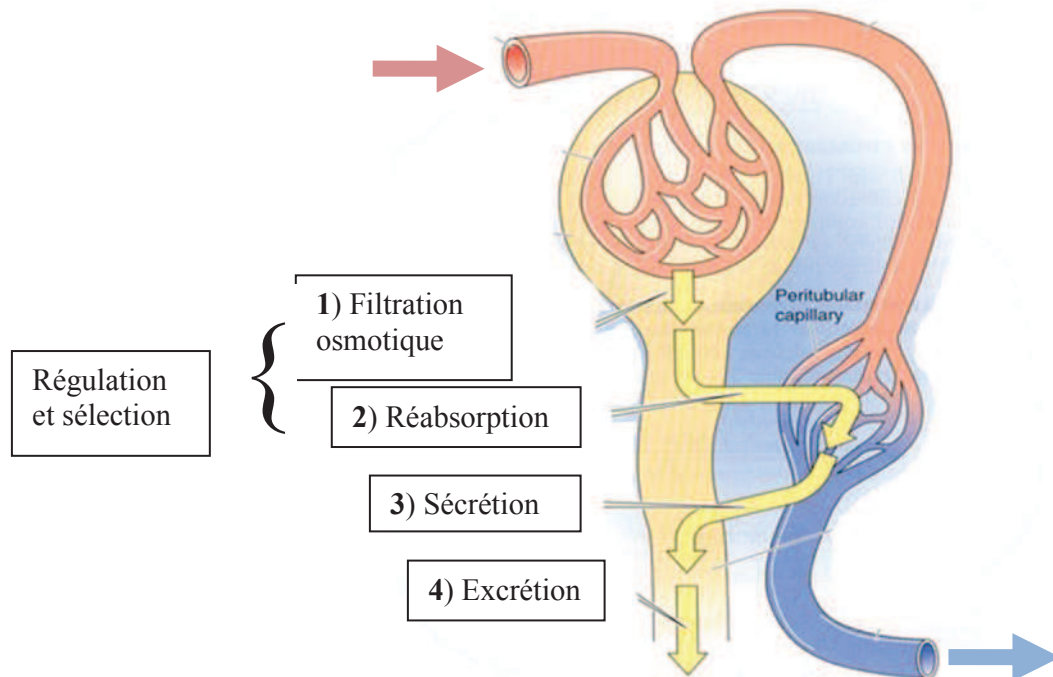
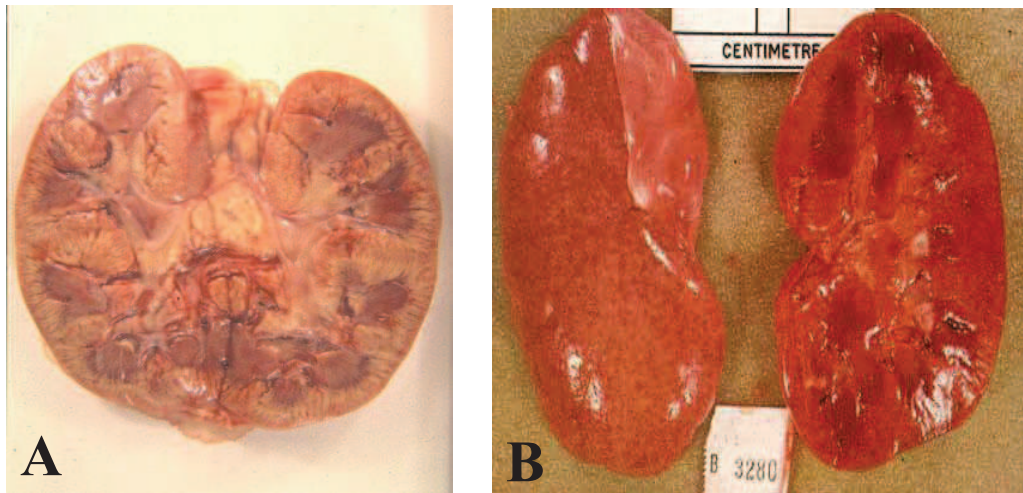


Schéma 7: Schéma du néphron. Fonctions du rein. L'excrétion ou l'élimination des déchets métaboliques se font via les mécanismes de filtration glomérulaire, de réabsorption de sécrétion des métabolites. Adapté de Medical Physiology, WF Boron, EL Boulpaep, Saunders, Elsevier Science, 2003, chap. 32, p. 749).

### I.2.1.3 Les atteintes rénales au cours du lupus :

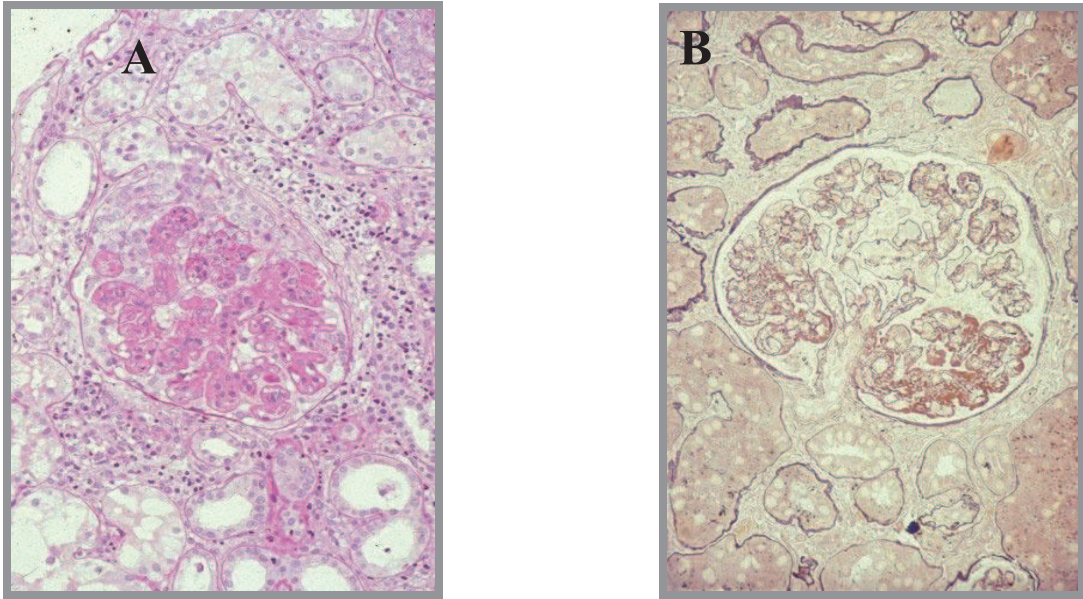
Le syndrome néphrétique au cours du lupus peut se définir comme une inflammation des glomérules, entraînant un passage des protéines et des globules rouges (hématies) du sang dans les urines accompagné d'une poussée d'hypertension artérielle, et souvent d'une insuffisance rénale aiguë (Avihingsanon and Hirankarn, 2010; Niemir and Wagrowska-Danilewicz, 2010). Le lupus néphrétique reste la manifestation commune la plus sévère du LED et est caractérisé par la présence d'auto-anticorps qui jouent un rôle central dans cette inflammation chronique. Parmi plus de 100 auto-anticorps décrits dans le LED à nos jours, seulement très peu d'entre eux ne ciblent pas les glomérules (D'Cruz, 2009; Gerli and

Caponi, 2005). Les auto-anticorps anti-glomérulaires sont capables d'interférer avec le métabolisme cellulaire, de pénétrer dans les cellules vivantes et d'induire la prolifération des cellules du glomérule (Gerli and Caponi, 2005). De plus ces anticorps anti-glomérulaires comprennent les anticorps anti- $\alpha$ -actine, anti-laminine-1, anti-fibronectine, anti-myosine, and anti-collagène (Hanrotel-Saliou et al., 2010).



*Figure 11. Apparence macroscopique d'un rein de patient atteint du LED in SLE. A : Il est enflé, œdémateux et pale à cause de la circulation sanguine réduite dans les glomérules. La teinte jaunâtre est dû au stockage des lipides qui est subséquent à la protéinurie (Giannakakis and Faraggiana, 2010). B : rein de sujet sain.*

Le LED est un prototype de maladie due au dépôt de complexes immuns et les régions glomérulaires les plus touchées sont les espaces subendothéliaux ou subépithéliaux et le mésangium. La prolifération cellulaire ou mieux encore l'hypercellularité dans le glomérule est la conséquence typiques de la déposition des complexes immuns dans le rein pouvant affecter la fonction des capillaires et le compartiment mésengial (Liu et al., 2010). La prolifération est secondaire aux dépôts de complexes immuns ; mais c'est le type de la composition du complexe qui détermine la cause de l'hypercellularité. Il n'y a pas de corrélation entre la taille de dépôt de complexes immuns et la sévérité de la réponse proliférative. De récentes études suggèrent que l'anticorps anti-C1q est fortement associé au développement de néphrite proliférative dans le lupus (Smith and Gordon, 2010). Les cellules mésengiales sont fréquemment augmentées en nombre dans toutes les formes de lupus néphrétique et le dépôt de complexes immuns dans le mésengium est souvent considéré comme signe d'atteinte rénale.



*Figure 12: Structures de glomérules de patient lupique. A* : Glomérulonéphrite lupique : avec une forme sévère d’hypercellularité intracapillaire due à l’infiltration de cellules inflammatoires et à un moindre degré une prolifération endothéliale. *B* : Lésions glomérulaires non proliférative induite par une déposition massive de complexes immuns en large quantité visible au microscope optique comme le montrent les taches noir le long des capillaires (Giannakakis and Faraggiana, 2010).

#### **I.2.1.4 Collaboration scientifique entre l’ équipe de Claire LUGNIER et celle d’Eric ROUSSEAU**

Il existe une longue et fructueuse collaboration entre l’équipe de recherche du Dr Claire LUGNIER qui s’intéresse à l’implication des phosphodiesterases des nucléotides cycliques dans divers pathologies et celle du Pr Eric ROUSSEAU qui travaille dans le domaine de la physiologie pulmonaire et la signalisation lipidique. Dans le cadre mon admission au Collège Doctoral Européen des Universités de Strasbourg, j’ai entrepris une thèse en cotutelle avec l’Université de Sherbrooke. Dans la continuité d’étudier les propriétés anti-inflammatoires du NCS 613 *in vitro* chez l’humain, j’ai utilisé un modèle d’inflammation bronchique mise au point par Caroline MORIN et Eric ROUSSEAU : des bronchioles humaines rendues hyperréactives par le traitement de 72h au TNF $\alpha$ . Le développement des inhibiteurs de PDE4 suscitent à l’heure actuelle un fort intérêt dans le traitement de l’asthme et la MPOC; il m’a paru intéressant de tester ce composé sur ce modèle d’inflammation induit *in vitro* au TNF $\alpha$ . Mes deux séjours de recherches dans le laboratoire du Pr Eric ROUSSEAU m’ont permis de tester les propriétés anti-inflammatoires et broncho-relaxantes du NCS 613 sur des bronches



provenant de plusieurs patients et de proposer un projet de recherche sur les PBMC issus du sang de sujets sains et de patients lupiques.

## **I.2.2 L'asthme**

L'asthme est une affection pulmonaire récurrente touchant les voies aériennes supérieures et notamment les bronches, définie comme étant une gêne respiratoire à l'expiration. La maladie s'explique par trois mécanismes caractéristiques : une inflammation avec œdème de la sousmuqueuse de l'épithélium bronchique ; une broncho-constriction résultante d'une hyperréactivité bronchique qui se manifeste en parallèle à une sécrétion accrue de mucus, et long terme avec un remodelage des voies respiratoires supérieures (Busse, 2010). Cette maladie inflammatoire chronique des bronches se traduit par des difficultés de respiration à l'expiration, ce qui a valu le nom asthme (asthma du grec signifie difficulté de respiration) (Holley and Boots, 2009). Nous décrivons l'anatomie et le fonctionnement de l'appareil respiratoire afin de mieux comprendre la physiopathologie de l'asthme.

### **I.2.2.1 Anatomie fonctionnelle de l'appareil respiratoire**

La principale fonction du système respiratoire est de fournir de l'oxygène à l'organisme et de le débarrasser du gaz carbonique. Cette fonction se fait par l'intervention de quatre processus qui sous-tendent la respiration (TORTORA et al., 2001) : 1) La ventilation mécanique correspond à la circulation de l'air dans les poumons dans le but de renouveler sans cesse les gaz qui s'y trouvent (phénomène communément appelé respiration) ; 2) La respiration externe qui est la diffusion de l'oxygène des poumons vers le sang et la diffusion du gaz carbonique du sang vers le poumon ; 3) Le transport des gaz respiratoires qui est : le transport de l'oxygène des poumons aux cellules et du gaz carbonique du sang vers le poumon, ce rôle est assuré par le système cardiovasculaire et le sang, 4) La respiration interne qui est la diffusion de l'oxygène du sang vers les cellules et la diffusion du gaz carbonique des cellules vers les capillaires.

Le système respiratoire comprend le nez avec ses cavités nasales, le pharynx, le larynx, la trachée, les bronches et ses ramifications (les sacs alvéolaires). Ce système se compose : d'une **zone de conduction** qui inclut toutes les voies respiratoires et la **zone respiratoire** qui est le siège des échanges gazeux, composée de structures exclusivement microscopiques (bronchioles, alvéoles). Les voies de conduction extra-pulmonaires humidifient, purifient et ajustent la température de l'air inspiré (Marieb, 2010). La purification

et l'humidification sont réalisées par la muqueuse respiratoire. La trachée se divise en deux bronches principales. Une fois entrées dans les poumons, les bronches principales se subdivisent en bronches lobaires ou secondaires dont 3 à droite et 2 à gauche. Ces dernières donnent naissance à des bronches segmentaires ou tertiaires. Les conduits aériens mesurant moins de 1 mm de diamètre, appelés bronchioles, pénètrent dans le lobule pulmonaire. Les bronchioles se divisent en bronchioles terminales, qui mesurent moins de 0,5 mm de diamètre. Il y a en tout entre 20 et 25 ordres de conduits aériens dans le poumon dont on désigne l'ensemble par le terme d'arbre bronchique ou respiratoire. La composition des parois des bronches principales est analogue à celle de la trachée, mais au fil des ramifications, on observe des changements de structures : modifications des structures de soutien, modifications du type d'épithélium et accroissement de la proportion de muscle lisse. Les structures de la zone respiratoire sont caractérisées par la présence de sacs à parois minces remplis d'air, appelés alvéoles pulmonaires. Les bronchioles respiratoires se prolongent par des conduits sinueux appelés conduits alvéolaires dont la paroi est formée de cellules musculaires lisses, de fibres de tissus conjonctifs ainsi que d'alvéoles. Les quelques 300 millions d'alvéoles constituent la majeure partie du volume des poumons et offre une aire extrêmement étendue aux échanges gazeux. La paroi des alvéoles pulmonaires est composée à 95 % d'une couche unique de cellules squameuses au cytoplasme très étendue appelées épithéliocytes ou pneumocytes de types I. La paroi des alvéoles et des capillaires ainsi que leurs lames basales fusionnent pour former la membrane alvéolo-capillaire qui joue un rôle important de barrière air-sang. Les échanges gazeux se font par diffusion simple à travers la membrane alvéolo-capillaire où l'O<sub>2</sub> passe des alvéoles au sang et le CO<sub>2</sub> du sang aux alvéoles. Les pneumocytes de type II ou grands épithéliocytes sécrètent le surfactant qui tapisse les surfaces des alvéoles et favorise les échanges gazeux. Les alvéoles pulmonaires sont entourées de fibres élastiques fines, possèdent des pores du septum interalvéolaire permettant de réguler la pression de l'air dans les poumons et possèdent aussi des macrophages alvéolaires assurant l'élimination des microbes des microbes.



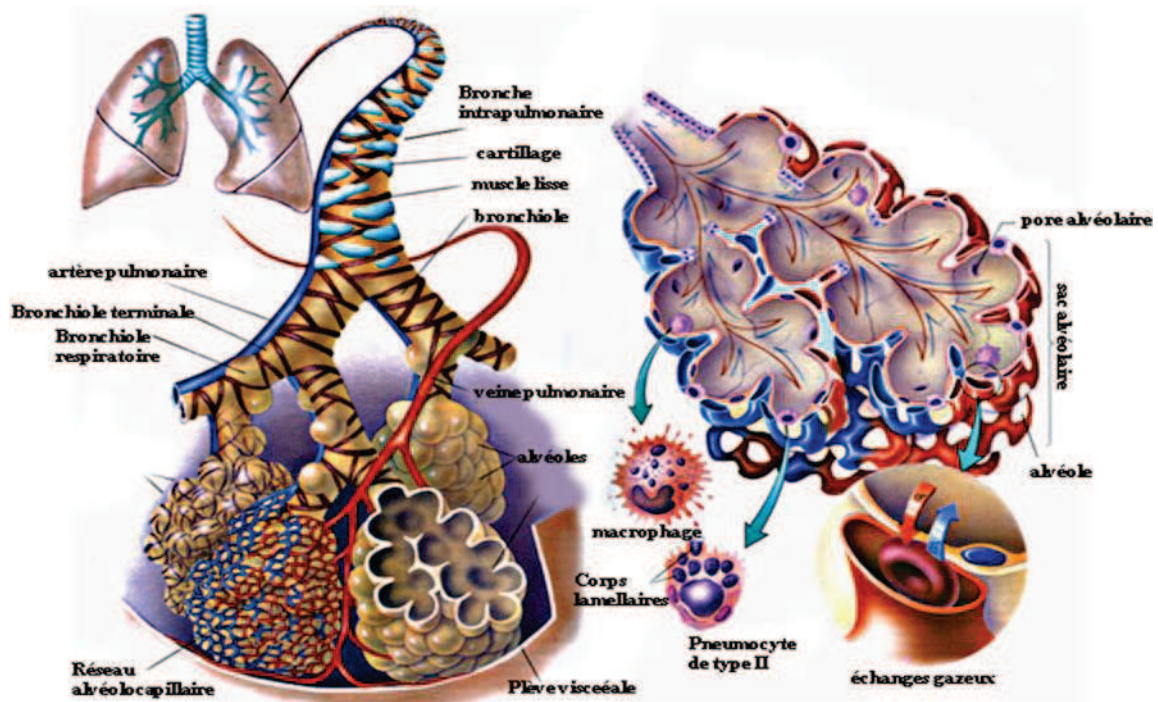


Schéma 8: Voie aérienne de conduction et zone respiratoire du système respiratoire. Schéma représentant l'anatomie pulmonaire et les zones de conduction et respiratoires dans le poumon humain (Gartner et al., 1997 ).

La ventilation pulmonaire est un processus mécanique qui repose sur des variations de volume se produisant dans la cavité thoracique. Les variations de volume engendrent des variations de pression, les variations de pression provoquent l'écoulement des gaz et les gaz s'écoulent pour égaliser la pression (Tortora et al., 2001). Au cours d'une inspiration normale, le diaphragme en se contractant s'abaisse (s'aplatit), et la hauteur de la cavité thoracique augmente de volume grâce à la contraction des muscles intercostaux externes ce qui élève la cage thoracique et pousse le sternum vers le haut. L'expiration normale est un processus passif qui repose sur la relaxation des muscles inspiratoires et à un second degré sur l'élasticité naturelle des poumons.

La régulation centrale de la respiration est assez complexe et repose sur l'activité des neurones de la formation réticulaire dans le bulbe rachidien. Il s'agit du groupe respiratoire dorsal qui est le générateur du rythme respiratoire (centre inspiratoire) dont les influx nerveux parcourent les nerfs phréniques, les nerfs intercostaux et le groupe respiratoire ventral composé de neurones inspiratoires et expiratoires. On retrouve à la surface des cellules des muscles lisses des voies respiratoires (MLVR), une population diverse de récepteurs auxquels se lient les neurotransmetteurs et autres modulateurs. Le tonus des cellules de MLVR est régulé par les effets de ces facteurs responsables de l'activation des adrénoccepteurs  $\beta_2$ , des

récepteurs cholinergiques (muscariniques M3 et M2), des récepteurs au VIP, aux tachykinines, au CGRP, des récepteurs histaminergiques et plusieurs récepteurs additionnels activés par des médiateurs lipidiques ou des dérivés des cellules du système immunitaire ou épithéliales (Barnes, 1998; Stephens, 2001).

**Tableau 7: Broncho-constricteurs et bronchodilatateurs des muscles lisses respiratoires et leurs récepteurs associés (Revue par Barnes, 1998).**

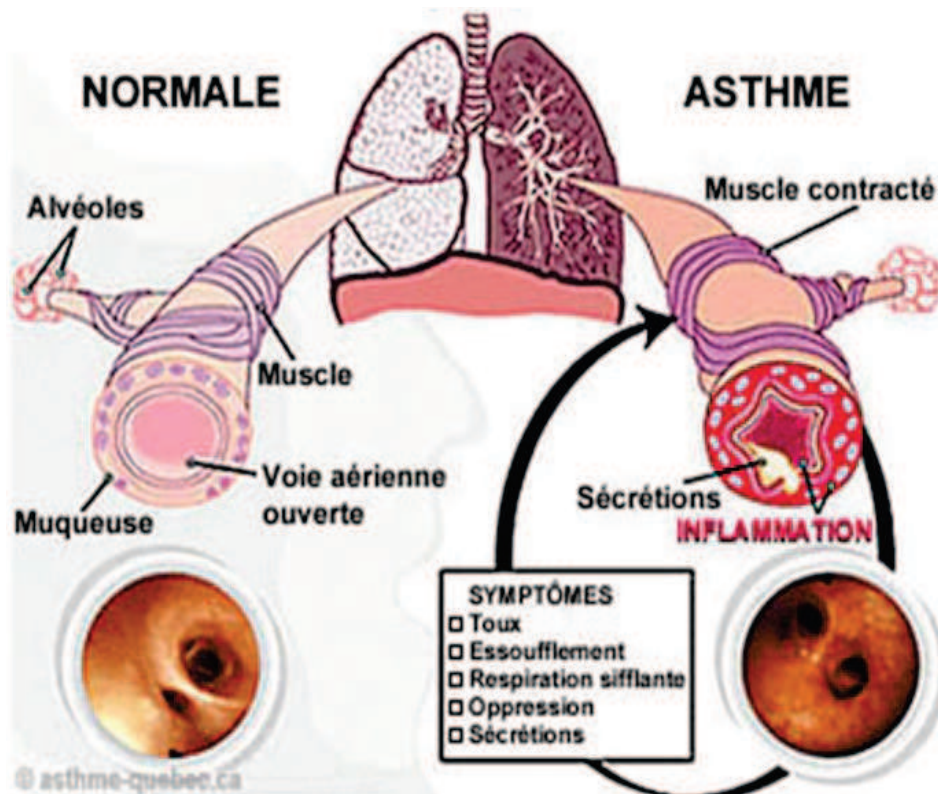
Bronchoconstricteurs				Bronchodilatateurs		
Médiateurs	Récepteur	Neurotransmetteur	Récepteur	Bronchodilatateur	Récepteur	Seconds messengers
Histamine	H1	Acétylcholine	M3 (M2)	Epinéphrine	b2-Adrénergique	cAMP
Cys leukotriènes	Cys LT1	Substance P	NK2	Vasoactive intestinale peptide	PVR1	cAMP
Thromboxane	TP	Neurokinine A	NK2	PACAP	PVR1	cAMP
Prostaglandine D2	TP (DP)	CGRP†	CGRP1/2	Prostaglandine E2	EP	cAMP
	TP (FP)	Neuropeptide Y	Y2	Prostacycline	IP	cAMP
Prostaglandine F2a						
Isoprostanes	TP	Cholecystokinine	CCKA	Adrénomedulline	AM	cAMP
Platelet-activating factor	PAF	Bombésine GRP	BN	Atrial Natriuretic Peptide ANP	Guanylyl cyclase-A	cGMP
Sérotonine*	5HT2			Nitric oxide	Guanylyl cyclase (soluble)	cGMP
				EET	TP	
Bradykinine	B2					
Endothéline-1	ETB					
Adénosine	A2b					
Angiotensine II	AT-1					

### **I.2.2.2 Les maladies inflammatoires chroniques des systèmes respiratoires : asthme, la bronchopneumonie obstructive chronique (BPCO)**

Le système pulmonaire est particulièrement exposé aux agents infectieux tels que les microorganismes de l'air (Cramer et al., 2010). Parmi les troubles respiratoires les plus invalidants on peut citer : la broncho-pneumonie obstructive chronique (BPCO), l'asthme, la tuberculose et le cancer de poumon. La BPCO est une affection respiratoire qui touche

presque tous les fumeurs provoquant une dyspnée accompagnée de toux et d'infections récurrentes (Ishii et al., 2010). Elle dégénère couramment en insuffisance respiratoire accompagnée d'hypoxémie, de rétention du CO<sub>2</sub> et d'acidose respiratoire. L'emphysème se caractérise par une distension des alvéoles associée à une détérioration des parois alvéolaires. L'inflammation chronique conduit à la fibrose pulmonaire et inéluctablement à la perte de l'élasticité pulmonaire. Cette inflammation peut entraîner un remodelage des voies respiratoire et l'hyperréactivité bronchique (Savineau, 2007). Les poumons ayant perdu leur élasticité, les conduits aériens s'affaissent pendant l'expiration et entravent l'expulsion de l'air (Gonzalez et al., 2010). L'asthme se caractérise par des épisodes de toux, de dyspnée, de respiration sifflante et de gêne respiratoire. Souvent inclus dans la BPCO en raison de sa nature obstructive, l'asthme est caractérisé par une alternance de périodes aiguës et de périodes asymptomatiques. Chez les personnes souffrant d'asthme allergique, l'inflammation persiste même durant les périodes asymptomatiques, entraînant une hypersensibilité des voies aériennes. L'épaississement des parois aériennes par l'exsudat inflammatoire amplifie grandement l'effet bronchospasme et peut réduire considérablement l'écoulement de l'air (Westergren-Thorsson et al., 2010). L'usage du tabac détruit les défenses mécaniques des voies respiratoires (les poils du nez, le mucus et les cils) contre les agents irritant chimiques et biologiques. Les effets irritants de quelques 15 oncogènes et radicaux libres présents dans la fumée du tabac peuvent causer à long terme le cancer du poumon (Tournier and Birembaut, 2010). Trois principales formes de cancer du poumon ont été décrites : 1) l'épithélioma épidermoïde bronchique (20 à 40 % des cas de cancer) qui apparaît dans l'épithélium des grosses bronches, 2) l'épithélioma glandulaire ou adénocarcinome (de 25 à 35 % des cas) qui débute en périphérie des poumons sous forme de nodules solitaires émergeant des glandes bronchiques et des cellules alvéolaires, 3) l'épithélioma à petites cellules du poumon (20 à 25 % des cas) qui comprend des petites cellules semblables à des lymphocytes qui prennent naissance dans les bronches principales et s'étendent progressivement dans le médiastin sous forme de petites grappes.

## A) Physiopathologie de l'asthme



## B) Coupes histologiques de biopsies bronchiques

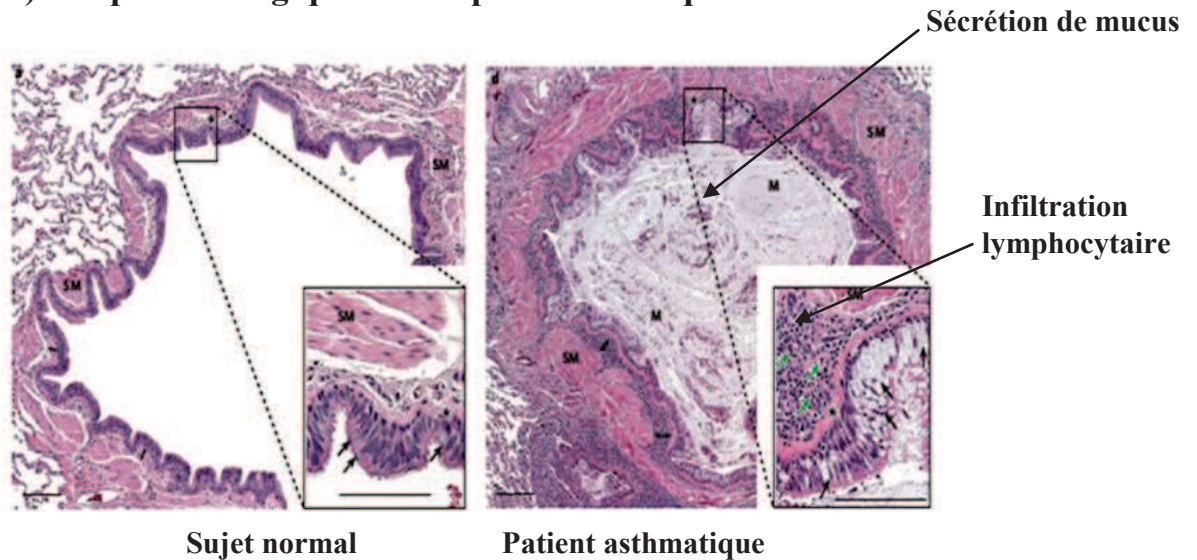


Figure 13 : Inflammation chronique allergique et remodelage tissulaire dans l'asthme. A : L'inflammation chronique des bronches au cours de l'asthme conduit à une obstruction des voies respiratoires. B : Des sections de coupes de voies respiratoires colorées à l'hématoxyline-éosine d'un sujet normal (non-asthmatique) et d'un patient asthmatique. La coupe provenant du patient asthmatique montre un épaissement de la paroi bronchique avec une filtration lymphocytaire. (Revue; Galli et al., 2008).



### I.3 Justification de la problématique de recherche

L'inflammation chronique est un processus délétère qui survient dans de nombreuses pathologies connues sous le nom de maladies inflammatoires chroniques (Avihingsanon and Hirankarn, 2010 ; Schett and David, 2010). En aval des récepteurs, les phosphodiesterases cycliques, jouent un rôle majeur dans le contrôle normal et pathologique de la réponse cellulaire. Parmi ces PDEs, la famille des PDE4s, est majoritairement exprimée dans les cellules immunitaires de l'inflammation (Sanz et al., 2005). Un taux élevé d'AMPc intracellulaire dans les cellules inflammatoires ou immunocompétentes entraîne une réduction voire la suppression de la sécrétion des médiateurs de l'inflammation incluant les cytokines et les espèces réactives de l'oxygène. Chez la souris BalB/c infectée par *Mesocostoides corti*, les inhibiteurs de PDE4 entraînent une baisse de la sécrétion d'IL-13 par les lymphocytes T (Souness et al., 1999). Également, ces inhibiteurs de PDE4 provoquent une suppression de la production de cytokines comme IL-2, INF $\gamma$  et IL-4/5 induite par l'infection de *Staphylococcus enterotina-A* (Link et al., 2008). Plus important, chez les souris transgéniques knock-out pour le gène de la PDE4B, il a été montré une diminution significative de la production de TNF $\alpha$  induite par le lipopolysaccharide chez les macrophages de ces souris (Jin et al., 2005). En somme, l'inhibition des PDE4s augmente l'AMPc intracellulaire provoquant la suppression d'une grande partie des fonctions des cellules de l'inflammation (basophiles, lymphocytes, éosinophiles, mastocytes, neutrophiles) telles que la migration cellulaire, la libération de cytokines ou la production d'espèces réactives de l'oxygène (Essayan et al., 1997; Hatzelmann and Schudt, 2001; van der Staay et al., 2008, Hertz et al., 2009). Ces observations font de PDE4 une cible thérapeutique attractive pour traiter l'inflammation (Houslay et al., 2005).

Des traitements du lupus sont en cours de développement chez l'animal comme chez l'homme. Les traitements des maladies auto-immunes ciblent les anticorps anti-ADN, des cytokines, chemokines, les spliceosomes. Il n'y a pas à ce jour de traitement spécifique du lupus prévenant sa progression. Les traitements actuels du lupus sont lourds et le plus souvent non spécifiques, exposant les patients aux infections. Il existe très peu de littérature concernant le rôle des PDEs dans le lupus mais quelques publications vont dans le sens de cette hypothèse. Dans les années 90, il a été montré chez les patients lupiques une diminution d'AMPc dans les lymphocytes T dont la fonction est altérée lorsque la maladie est active (Hasler, 1990). De plus un défaut de phosphorylation dépendant de l'AMPc a été observé dans les lymphocytes intacts de patients en phase de lupus actif (Hasler, 1990). Ce défaut de réponse des lymphocytes T pourrait être associé à une surexpression ou activation des PDE4s

dans les cellules T. Ceci pourrait conduire à une absence de la fonction immunosuppressive des lymphocytes T permettant de contrôler un processus inflammatoire. La forte sécrétion d'auto-anticorps provoque des dommages tissulaires parmi lesquels les atteintes rénales sont les plus fréquentes et redoutables. L'insuffisance rénale caractérisée par une protéinurie assombrit le pronostic vital des patients. Par ailleurs, récemment nous avons montré une augmentation de l'activité de la PDE4 au niveau du cortex rénal chez le rat cirrhotique caractérisé par une dysfonction rénale, cette dernière étant améliorée significativement par l'administration d'un inhibiteur de PDE4 (Ahloulay et al., 2005). La dysfonction rénale représente le stade ultime du lupus. Cette dernière observation et le faisceau de données concernant le lupus étayent fortement notre hypothèse concernant l'implication des PDE4 dans le lupus et confortent notre invention concernant le traitement spécifique du lupus avec un inhibiteur de PDE4s, le NCS613. (Monneaux et al, 2008).

Du côté pulmonaire, il est connu que l'inflammation chronique provoque un déclin des fonctions respiratoires due à la fibrose qui est à l'origine de l'hypersécrétion de mucus et de la destruction des alvéoles (Gonzalez et al., 2010). L'asthme est caractérisé par l'hyperréactivité bronchique (HRB) qui résultent du remodelage tissulaire et de l'obstruction des voies respiratoires (Fireman, 2003; Gibson et al., 2010). Le niveau d'HRB dépend des problèmes inflammatoires qui modifient la structure de l'arbre bronchique et le statut fonctionnel des muscles lisses. Chez des patients asthmatiques démontant une l'HRB, le rôle de barrière de protection de l'épithélium respiratoire est diminué ou parfois inexistant (Chakir et al., 2003; Tulic and Hamid, 2006). Cette perte d'intégrité et de fonctionnalité de l'épithélium bronchique serait causée par la libération de médiateurs inflammatoires et de produits cytotoxiques, des enzymes protéolytiques (métalloprotéase matricielle-9) et des protéases (tryptase, chymase) par les cellules sanguines (Todorova et al., 2010). Les dommages de l'épithélium causent la perte de cette barrière de protection : les allergènes et les agents nocifs peuvent pénétrer les voies respiratoires et atteindre plus facilement la sous-muqueuse où ils peuvent induire des réactions inflammatoires sévères. Une augmentation de la réactivité menant à l'HRB peut se produire car l'épithélium sécrète des substances qui augmentent la contractilité des MLVR (Stephens et al., 2003). Il a été montré que la PDE4A est impliquée dans l'inflammation pulmonaire due au tabagisme et que l'augmentation du taux d'AMPC intracellulaire avait un effet anti-inflammatoire (Barber et al., 2004). De plus les souris dépourvues de PDE4D (« Knock Out ») deviennent réfractaires à la stimulation cholinergique (Mehats et al., 2003). Ces enzymes seraient donc impliquées dans le contrôle de la tonicité des muscles lisses en condition normale (Alvarez et al., 2006) et notamment dans le processus

physiopathologique de l'hyperréactivité bronchique. Les PDE4 ont été désignées comme une cible attractive pour le traitement de l'asthme et du BPCO (Ulrik and Calverley, 2010; Yao et al., 2008; Houslay et al. 2005 ). Des inhibiteurs de PDE4 sont en cours de développement à des phases cliniques avancées, notamment le roflumilast vient d'obtenir son autorisation pour la mise en marché sous le nom de Daxas<sup>®</sup>. Cependant il existe relativement très peu de littérature sur la caractérisation de l'activité et de l'expression des PDE4s hydrolysant spécifiquement l'AMPc dans les différents tissus pulmonaires humains (parenchyme, bronchiole humaine et artère pulmonaire).



## **I.4 But et objectifs de recherche**

Ce projet de recherche fait suite à un dépôt de brevet effectué par mon équipe d'accueil en collaboration avec l'équipe de Sylviane Muller, concernant l'effet bénéfique du NCS613, un inhibiteur spécifique de PDE4 sur la progression du lupus chez la souris.

Le but de ce travail est d'étudier le rôle des PDE4 et les conséquences de leur inhibition dans l'inflammation chronique en prenant pour modèles le lupus érythémateux disséminé (LED) et l'hyperactivité bronchique humaine induite par le TNF $\alpha$ , *in vitro*.

### **I.4.1 Objectifs spécifiques dans le cas du lupus**

- Caractériser les PDE4s dans le parenchyme humain et les bronchioles.
- Démontrer l'implication des PDE4 dans le lupus chez la souris et dans les cellules sanguines (PBMC) des patients lupiques.
- Analyser le rôle des voies de signalisations impliquées dans l'inflammation comme p38-MAPK, I $\kappa$ B $\alpha$ , NF $\kappa$ -B et PDE4.

### **I.4.2 Objectifs spécifiques dans le cas de l'asthme**

- Analyser le profil des isoformes de PDE4 dans le parenchyme pulmonaire humain.
- Démontrer le pouvoir relaxant du NCS 613 sur les bronchioles humaines rendues hyper-réactives suite à un traitement au TNF $\alpha$ .
- Caractériser l'effet vaso-relaxant du NCS 613 sur les artères pulmonaires humaines dans des bains à organes isolés.

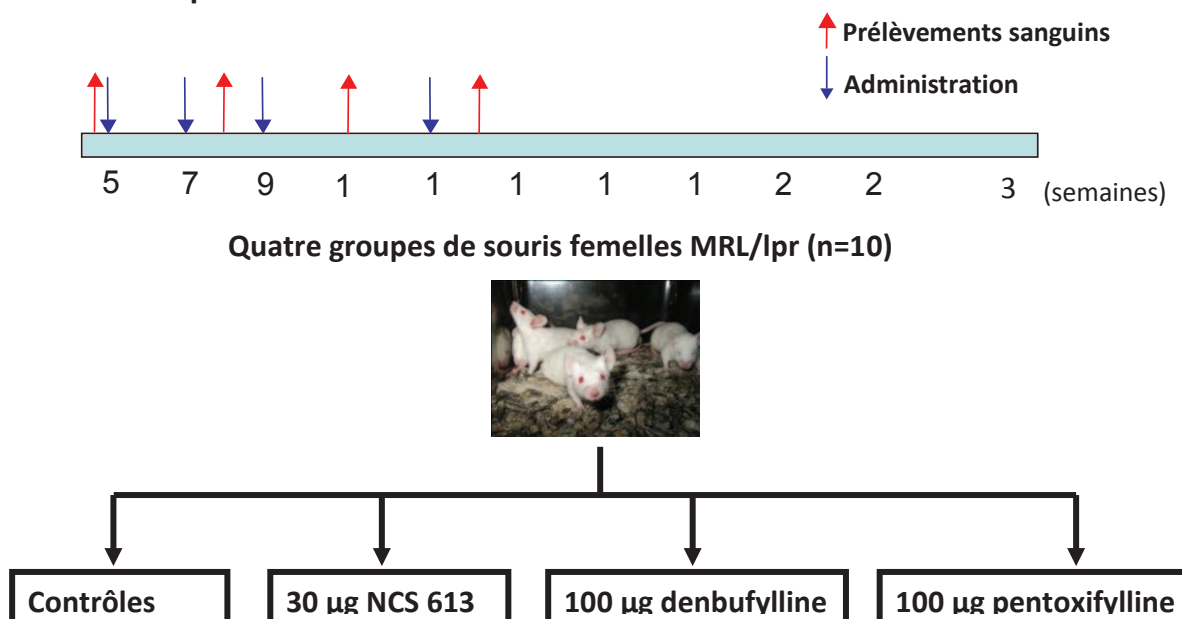
## II) MATERIEL AND METHODES

Le matériel et les méthodes couramment utilisés au cours de ce projet sont décrits dans les manuscrits insérés dans ce mémoire de thèse. Nous reprendrons brièvement quelques méthodes.

### II.1 Animaux et traitements

Des souris femelles CBA/J (H-2k) prises pour contrôles et des souris lupiques MR/lpr (H-2k) provenaient de chez Harlan (Gannat, France). Toutes les expériences réalisées ont été approuvées par le comité institutionnel sur l'expérimentation animal CREMEAS. Les souris MRL/lpr sont de 8 semaines n'ont aucun signe clinique de la maladie et elles sont considérées comme pré-lupiques. Elles sont vraiment lupiques à 18 semaines et développent des signes caractéristiques du lupus comme l'érythème, la protéinurie qui est un signe de dysfonction rénale et la production d'anticorps anti-ADN double brin. Les souris CBA/J et MRL/lpr âgées de 5 semaines sont traitées par voie intraveineuse par le NCS 613, la denbufylline et la pentoxifylline. Les souris non traitées (10 de chaque lot du NCS 613) ont reçu le véhicule. Ces administrations ont été répétées 2 fois à des intervalles de 2 semaines et une dernière fois à 4 semaines avant le sacrifice des animaux. Après 6 semaines de traitements les animaux ont été sacrifiés et des organes (rein, rate, foie, cœur et cerveau) ont été immédiatement prélevés, puis gardés à -80 °C.

#### Protocole expérimental



## II.2 Préparation des extraits tissulaires (protéines) et des ARN totaux à partir des organes congelés

Les organes de souris (le rein, la rate, le cœur, le foie et le cerveau) ont été broyés au mortier dans le l'azote liquide. Les poudres ont été remises en suspension et homogénéisées au Potter verre à verre dans un tampon contenant des inhibiteurs de protéases (20 mM Tris, 2 mM acétate de Mg<sup>2+</sup>, 5 mM EGTA, pH 7.5, 1 mM dithiothreitol, 10 µg/ml aprotinine, 10 µg/ml leupeptine, 10 µg/ml Soybean Trypsin Inhibitor, 0.33 mM Pefabloc) à raison de 1 ml pour 200 mg de tissu. Les homogénats ont été centrifugées à 14 000 g pendant 10 min à 4 °C et les surnageants ainsi obtenus ont été aliquotés puis conservés à -80°C jusqu'à leurs analyses expérimentales (dosages radio-enzymatiques de PDE et Western blot).

Des échantillons d'organes de souris ont été broyés au mortier dans le l'azote liquide. Les poudres ont été remises en suspension et homogénéisées au Potter verre à verre dans un tampon de lyse (Qiazol<sup>®</sup>). Les ARN totaux ont été extraits des différents organes selon les recommandations du manufacturier et dans des conditions stériles et « RNase free » en utilisant une vaisselle stérilisée au four (280 °C pendant 4h) ou trempée dans la solution EDTA NaOH.

Enfin des échantillons de reins de souris ont été broyés au mortier dans le l'azote liquide puis homogénéisées au Potter verre à verre dans un tampon pour extraction de fractions subcellulaires selon les recommandations du fabricant en utilisant le kit « Millipore<sup>®</sup> ».

## II.3 Dosages radio-enzymatiques des activités PDEs

Il consiste à mesurer les activités hydrolytiques des phosphodiésterases vis à vis de l'AMPc et du GMPc. Le principe du dosage radio-enzymatique consiste à évaluer à l'aide d'un substrat tritié l'hydrolyse des nucléotides 3',5'-cycliques en 5'-nucléotides par les phosphodiésterases et la transformation des 5'-nucléotides en nucléosides par un excès de 5'-nucléotidase contenue dans le venin de serpent (SV= Snake Venom).

Ce dosage repose sur l'hydrolyse des nucléotides 3', 5'-cycliques en leur 5'-nucléotides respectifs par les phosphodiésterases (1) et la transformation des 5'-nucléotides en nucléosides par un excès de 5'-nucléotidase contenue dans le venin de serpent (2). Les nucléotides cycliques tritiés [<sup>3</sup>H]-AMPc ou [<sup>3</sup>H]-GMPc introduits comme traceurs dans le milieu réactionnel sont transformés sous l'action des PDEs en nucléotides radioactifs [<sup>3</sup>H]-AMP5' ou [<sup>3</sup>H]-GMP5', dont la mesure permet la quantification de l'activité des phosphodiésterases après avoir été convertis en nucléosides tritiés. La séparation du substrat

non hydrolysé et le produit de la seconde réaction (3) est réalisée par chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'anions formiates QAE-Sephadex A-25 (AMERSHAM). La radioactivité éluee est mesurée après ajout de liquide scintillateur à l'aide d'un compteur de rayonnement  $\beta$  à scintillation liquide (LKB 1209 RACKBETA) (4). (adapté d'après Keravis et al., 2005).

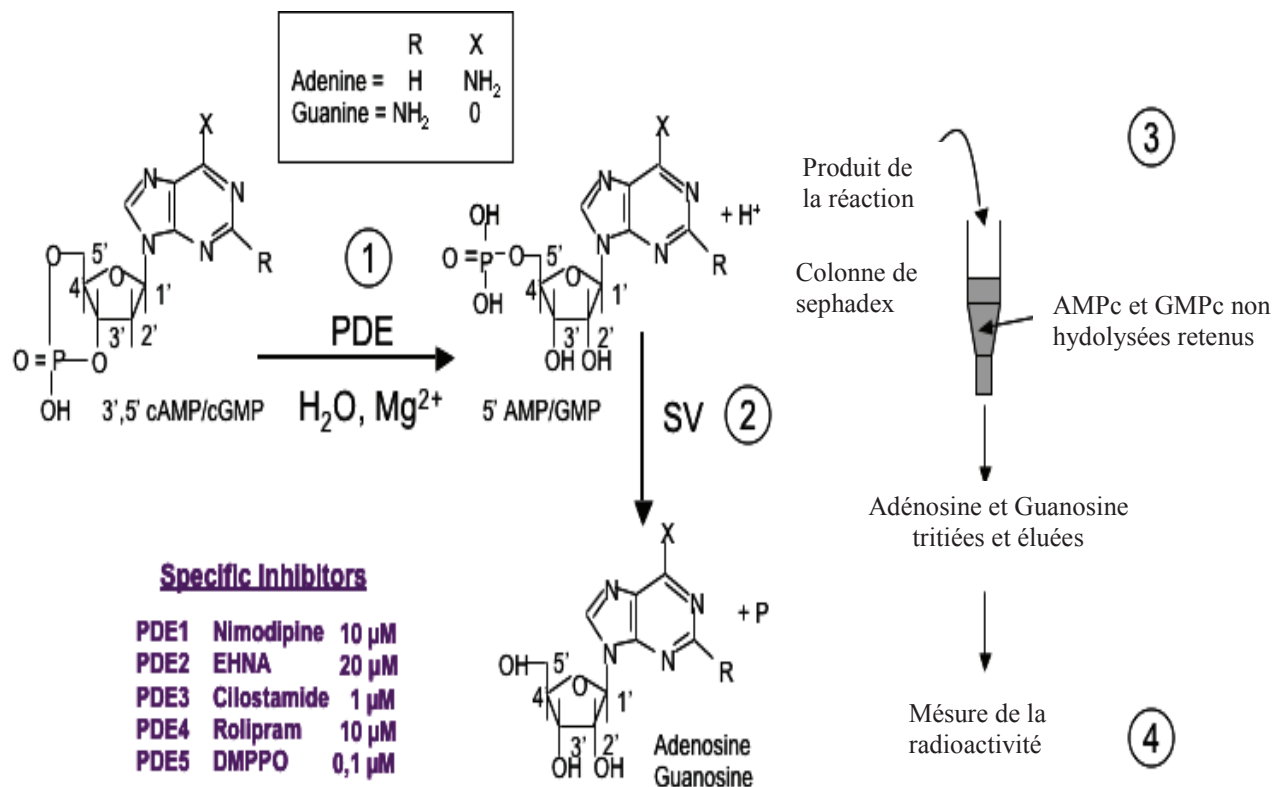


Figure 14 : Principe du dosage radioenzymatique. SV = Venin de Serpent.

Afin de travailler dans des conditions enzymatiques linéaires, les échantillons tissulaires ont été dilués avec un tampon contenant de l'albumine de sérum bovin (BSA) pour obtenir une activité des PDEs tissulaires correspondant à 15 % d'hydrolyse de la radioactivité totale en l'absence d'inhibiteurs. Les substrats (AMPc ou GMPc) ont été utilisés à la concentration de 1  $\mu$ M auxquels ont été incorporés 15000 cpm de nucléotides tritiés [<sup>3</sup>H]-AMPc ou [<sup>3</sup>H]-GMPc comme traceur en présence d'un tampon 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 2 mM acétate de Mg<sup>2+</sup> et 1 mM EGTA. Les activités totales et celle de chaque isoforme de PDEs ont été déterminées dans une même série de dosages. La contribution de chaque famille de PDE4 est évaluée en présence des inhibiteurs spécifiques qui bloquent l'activité hydrolytique de la PDE donnée. Ainsi la PDE1 est mesurée par l'activité résiduelle en présence de 10  $\mu$ M de nimodipine, 20  $\mu$ M d'EHNA pour la PDE2, 1  $\mu$ M de cilostamide pour la PDE3, 10  $\mu$ M de rolipram et 0,1  $\mu$ M de DMPP0. La PDE1, PDE2 et la PDE5 sont mesurés

en présence de 1 $\mu$ M de GMPc comme substrat ; les PDE3 et PDE4 en présence de 1 $\mu$ M d'AMPc. Une chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'anions formiates permet de séparer le substrat non hydrolysé du produit de la réaction. L'incorporation de nucléotides cycliques tritiés dans le milieu réactionnel comme traceurs permet la quantification de l'activité des phosphodiesterases. Ces inhibiteurs sont utilisés à des concentrations inhibant totalement la PDE cible et à moins de 10% les autres PDEs. L'activité spécifique de chaque isoforme correspond à l'activité totale moins l'activité après inhibition de cette isoforme (technique détaillé dans Keravis et al.; 2005).

#### **II.4 Techniques de Western blot**

Trente microgrammes de protéines d'extraits tissulaires ou cellulaires d'échantillons donnés ont été soumis à une migration SDS-PAGE sur des gels de 8 ou 10 % et transférés sur une membrane de PVDF (Amersham). L'immunodétection a été réalisée en utilisant différents anticorps spécifiques dirigés contre la PDE1A (PD1A-101AP, 1/2500), la PDE1B (PD1B-201AP, 1/2500), la PDE1C (PD1C-301AP, 1/2500), la PDE2A (PD2A-101AP, 1/1000), la PDE4A (PD4A-101AP, 1/2500), la PDE4B (PPD5-140AP, 1/1000), la PDE4C (PD4-301AP, 1/2500), la PDE4D (PD4-401AP, 1/2500) provenant de chez FabGennix Inc (Frisco, TX, USA). Les anticorps dirigés contre la PDE4A (AC55, 1/2000) et la PDE4B (K118, 1/2000) ont généreusement été offerts par M. Conti et ont été décrits précédemment (Richter et al., 2005). L'anti-vimentin (1/1,000), anti-EGFR (1/1,000), anti-p38 MAPK (1/1000), Anti-AMPK, anti-NF $\kappa$ B (1/2500) et anti-GAPDH (1/60,000) proviennent de chez Millipore. Les bandes immunoréactives ont été détectées par chemiluminescence en utilisant un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (1/60000; Promega), un kit ECL (GE Healthcare) et des films pour autoradiographie. Les signaux autoradiographiques ont été capturés sur un GeneGenius Bio Imaging System (Syngene) en utilisant le logiciel GeneSnap et analysés à l'aide du logiciel GeneTool. Les valeurs numériques des signaux des PDEs ont été normalisées par la densité des bandes de la GAPDH (1/60000; Chemicon). La GAPDH n'est pas affectée par les traitements.

## II.5 Techniques Real-Time PCR

Les ARNs totaux ont été isolés à partir de reins de souris MRL/lpr ou contrôles en utilisant le kit d'extraction RNeasy® kit de Qiagen comme mentionné ci-dessus. La quantification des ARN totaux a été faite par spectrophotométrie et leur pureté vérifiée par le rapport Abs260/absA280. L'intégrité des ARNs totaux a également été vérifiée par migration sur gel d'agarose de 4 % en conditions dénaturantes (rapport des intensités des bandes 28S/18S). La reverse transcription a été réalisée en utilisant le kit iScript® cDNA Synthesis de Bio-Rad à partir de 1 µg d'ARN total. Le protocole était le suivant : 5 min à 25°C (hybridation des hexamères) puis 30 min à 42°C (reverse transcription) et enfin 5 min à 85°C (inactivation de la reverse transcriptase). L'expression relative des gènes d'intérêt (PDEs) a été quantifiée par PCR en temps réel en utilisant le système de détection mono-couleur du thermocycleur MyIQ® (Bio-Rad Laboratories, Inc) et le kit iQ SYBR® Green Supermix (produit no. 170-8884). Le protocole d'amplification était le suivant : dénaturation à 95°C pendant 5 min, puis 40 cycles de 94°C pendant 10s (dénaturation), 60°C pendant 10s (hybridation des amorces oligonucléotidiques) et 72°C pendant 15s (élongation). A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN spécifiquement amplifiée par le couple d'amorces utilisées est multipliée par deux. Le milieu réactionnel contient le SYBR Green I qui est un agent intercalant entre les brins de l'ADN double brin, et devient un bon fluorophore. La fluorescence mesurée à la fin de chaque cycle d'amplification est donc proportionnelle à la quantité d'ADN double brin présente dans le milieu réactionnel. Il faut un certain nombre de cycles d'amplification avant que la fluorescence émise par le fluorophore franchisse une valeur seuil et devienne détectable (la fluorescence entre alors dans une phase d'amplification linéaire). Ce nombre de cycles est appelé Ct (« Threshold »). Plus le nombre de cycles d'amplification nécessaire pour détecter la fluorescence est faible (Ct bas), plus la quantité d'ADNc (et donc d'ARNm) du gène recherché est élevée au départ. Il devient alors possible de comparer les quantités relatives de chaque gène. La spécificité des produits d'amplification a été évaluée par l'analyse de la courbe de fusion. De plus, la taille des amplicons a été vérifiée par migration sur gel d'agarose en conditions dénaturantes. Tous les échantillons ont été traités en triplicats, selon les recommandations du fabricant.

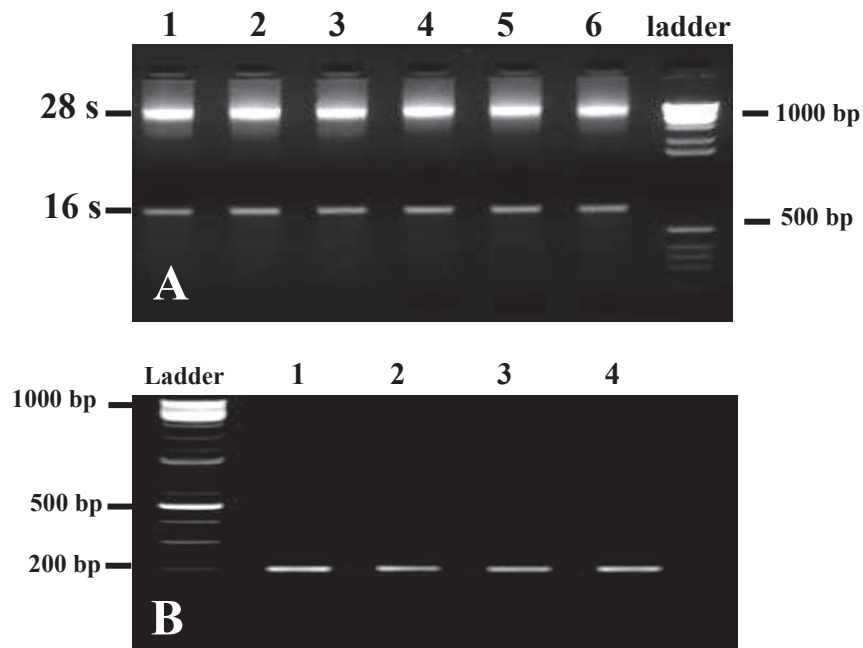


Figure 15 : Illustration d'un gel d'intégrité des ARN totaux (A) et d'un gel de vérification de la taille des amplicons (B) par électrophorèse en conditions dénaturante dans le tampon « TAE » 40 mM Tris-Acétate, 1mM EDTA pH 8,0. Le gel d'intégrité montre deux bandes spécifiques correspondant aux sous-unités 28S et 16S.

## II.6 Techniques d'immuno-histochimie

De coupes fines de rein de souris congelé dans l'azote d'environ 4  $\mu$ m ont été réalisées à l'aide d'un microtome. Deux dépôts sont réalisés sur une lame porte objet pour chaque reins puis gardés à -80°C pour utilisation ultérieure. Des frottis ont été réalisés à partir de cellules mononuclées du sang périphériques (PBMC) et gardés à -80°C. Avant le marquage à l'aide d'un anticorps spécifiques ces frottis ont été délimités au Dako Pen et fixés dans 4 % de paraformaldéhyde PFA pendant une nuit. Après rinçage dans du «Tris Buffer Saline» (TBS): 50 mM Tris , 150 mM NaCl pH 7.6) les frottis ont été saturés avec 4 % de PBS + BSA pendant 1 h à température ambiante. Les immuno-marquages ont été faits à l'aide d'anticorps spécifiques dirigés contre les PDE4 (4A, 4B, 4C, 4D) et NF $\kappa$ B diluées 1/100 puis révélés par un anticorps fluorescent Alexa 488 et Alexa 654. Les noyaux de cellules ont été marqués au DAPI (1/1000). Les lames ont été montées à l'aide de Vectashield (Mounting medium). La lecture des lames a été faite aux grossissements 40 X, 60 X et 100 X au microscope Leica.



## **II.7 Fractionnement subcellulaire du parenchyme**

Le parenchyme pulmonaire (tissu pulmonaire composé en majorité de pneumocytes I, des alvéoles, bronchioles respiratoires, canaux alvéolaires, les vaisseaux sanguins et les bronchioles) a été rincé dans le tampon d'homogénéisation : 300 mM saccharose, 20 mM K<sup>+</sup>-PIPES pH 7,0 + cocktail d'inhibiteur de protéases (2 comprimés de Complete<sup>®</sup> de Roche, pour 50 ml de solution). Le tissu a été coupé en petites tranches et homogénéisé au polytron (1 x 8000 rpm et 2 x 13500 rpm sur la glace) à raison de 1 g de parenchyme pulmonaire pour 5 ml de solution d'homogénéisation. Après ajustement du pH à 7,0 les tubes sont centrifugés à 6500 g dans un rotor de type 42.1 pendant 20 min à 4°C (8500 rpm) dans la centrifugeuse Beckman. Le surnageant a été filtré sur deux couches gaze de coton. Le culot de la première centrifugation contenant les noyaux, les mitochondries et les débris cellulaires a été récupéré et gardé sur la glace. Le filtrat a été ultracentrifugé à 85 000 g (33 000 rpm) dans un rotor de type 42.1 à + 4°C pendant une heure. Le surnageant correspondant a été aliquoté (la fraction cytoplasmique). Le culot de cette deuxième centrifugation a été resuspendu et homogénéisé dans 400 µl de solution de conservation (mM) : 300 saccharose, 500 K-PIPES pH 7,4 + le cocktail d'inhibiteurs de protéases ; puis aliquoté comme « fraction microsomale ». Le premier culot de centrifugation est resuspendu dans 40 ml de solution 2, 4 M saccharose, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,2 et filtré sur 2 couches de gaze. Le filtrat a été ultracentrifugé à 100 000 g (35 000 rpm) pendant 1 h. Le culot a été resuspendu progressivement dans un minimum de tampon d'homogénéisation et le volume ajusté à 20 ml ; puis centrifugé 15 min à 1000 g (2000 rpm) dans un rotor Ti 42.1. Le culot est resuspendu dans le tampon de conservation (mM) : 300 succharose, 500 K-PIPES pH 7,4 + le cokctail d'inhibiteurs de protéase puis aliquoté comme « fraction nucléaire ». La concentration des protéines est mesurée dans chacune des fractions produites.

## **II.8 Protocole de test de prolifération de cellules A59 avec incorporation de thymidine tritiée**

Les cellules A549 sont cellules de lignée d'adénocarcinome épithéliale humaine (Giard et al., 1973) obtenues de chez Abcam (# ab7910). Les cellules A549 ont été ensemencées dans une plaque de 24 puits à raison 10 000 cellules/puits dans le milieu de culture RPMI+ 1 % Streptomycine/ Pénicilline + 5 % FBS. Après 12 heures de croissance en culture, les cellules sont synchronisées en les faisant croître dans le milieu RPMI sans sérum «condition de privation qui permet de synchroniser les cellules en phase». Après 15 h de «déprivation», les cellules ont été traitées avec le NCS 613 : 0; 0,3; 1; 6,6; 10; 30 µM pendant

48 heures dans du RPMI+ 1 % Pénicilline/ Streptomycine + 1 % FBS. Après 48 heures de traitement, la thymidine tritiée a été incorporée dans le milieu de culture de renouvellement. La concentration finale de la thymidine tritiée a été de 1  $\mu$ M Ci. Les cellules traitées ont été laissées en croissance pendant 24 h. Un millilitre de milieu culture a été aspiré dans chaque puits et récolté dans un tube. 0,5 ml de Trypsine- EDTA a été ajouté puis incubé 15 min à 37° C. Dans un deuxième temps, 0,5 ml d'acide trichloracétique TCA 20 % froid a été ajouté dans chaque tube et incubé pendant 20 min à 4° C. Les extraits cellulaires ont été filtrés sous aspirations sur des papiers Whattman. Le papier filtre a été lavé avec de l'éthanol 96 % pour éliminer le PBS et précipiter l'ADN. Après avoir séché les filtres à l'air, ces derniers ont été placés dans des fioles à scintillation contenant déjà 5 ml de liquide de scintillation. Des papiers filtres correspondant aux puits de cultures cellulaires sans thymidine tritiée + 5 ml de liquide de scintillation ont été comptés comme « blanc ». Deux fioles contenant 2 ml de RPMI+ 1  $\mu$ l de thymidine tritiée + 5 ml de liquide de scintillation à servi au comptage de la radioactivité totale. La radioactivité a été comptée à l'aide d'un compteur  $\beta$  avec un programme permettant de compter scintillation pendant 5 min par tubes. La valeur des cpm (coup par minute) du blanc a été soustraite du comptage correspondant à une condition donnée. Les valeurs des duplicats de chaque condition à servi au tracé de la courbe d'IC<sub>50</sub>.

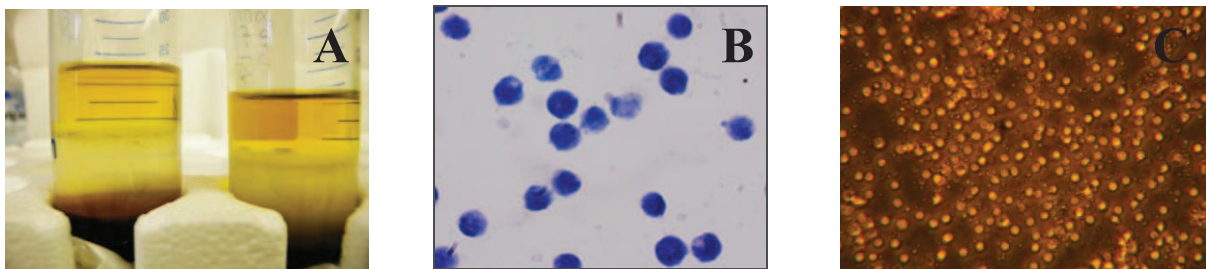
## **II.9 Cultures cellulaires et cultures organoïdes des tissus pulmonaires**

Notre projet de recherche sur le lupus chez le patient à été accepté par le comité d'éthique de la recherche chez l'humain (projet CRC 1075) et nous a permis de recruter 12 patients lupiques et 5 sujets sains. Le sang de patients prélevé sur anticoagulant EDTA-K<sub>2</sub> a servi à isoler des Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) ou cellules mononuclées du sang périphérique sur gradient de Ficoll. Dans un tube Falcon de 15 ml contenant 3 ml de Ficoll Plaque Plus, 4 ml de sang ont été ajoutés doucement à l'aide d'une pipette Pasteur sans mélanger le sang au Ficoll. Les tubes eppendorf ont été centrifugés à 400 g pendant 35 min à température ambiante (20°C). Après séparation, le surnageant (plasma) a été aspiré délicatement à l'aide d'une pipette Pasteur et la couche blanche sous-jacente récoltée dans un autre tube Eppendorf de 15 ml. Trois volumes du mélange (V/V) solution A (mM) : Glucose, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O, KCl, Tris pH 7,0 et de la solution B NaCl 0,9 % ont été ajoutés, puis centrifugés à 100 g pendant 10 min à T° ambiante. Un deuxième lavage a été fait en répétant l'opération. Les PBMCs ont été resuspendus dans 250  $\mu$ l de RPMI+ 10 % FBS et le comptage des cellules a été réalisé grâce à un compteur automatique de cellules Countness<sup>®</sup>. Les cellules (PBMC) ont été ensemencées en nombre égal (1,5 million par puits) dans une

plaque de 6 puits contenant 3 ml de milieu RPMI+ 1% Streptomycine/ Penicilline + 10 % FBS en conditions :

- contrôle
- 10  $\mu$ M NCS613
- 0,1  $\mu$ g/ml LPS
- 0,1  $\mu$ g/ml LPS + 10  $\mu$ M NCS613

La concentration finale de DMSO n'excédait pas 0,1 %. Les cellules ont été récoltées et lysées dans le tampon RIPA puis centrifugées ; le surnageant et le culot cellulaire ont été aliquotés et gardés à -80°C. La pureté de l'extraction a été vérifiée par un frottis coloré au Giemsa.



*Figure 16 Isolement et mise en culture de PBMC de patients lupiques et de sujets sains. Le sang prélevé sur anticoagulant a été séparé sur gradient de Ficoll (A). La pureté des cellules mononuclées a été vérifiée sur un frottis coloré au MayGrunwald Giemsa (B). Les cellules ont été cultivées dans du RPMI en différentes conditions pendant 48h (C).*

Les extraits cellulaires des PBMC ont permis d'analyser les voies de signalisation impliquées dans l'inflammation comme celles des PDE4B et 4C, p38- MAPK,  $I_{\kappa}B\alpha$  et  $NF_{\kappa}B$  par des techniques de Western blot et par immunocytochimie. Dans les surnageants de cultures cellulaires j'ai dosé par ELISA la sécrétion de certaines cytokines : IL-8.

Les cellules d'adénocarcinome d'épithélium humain (A549) ont été cultivées dans RPMI+ 1 % Streptomycine/ Pénicilline en présence de 10 % de FBS pour leurs croissances rapide puis « déprivées » dans un milieu de culture sans sérum. Ces cellules ont été traitées avec 5 et 10  $\mu$ M de NCS 613 pendant 72 h en présence de 10 ng/ml de  $TNF\ \alpha$  ou non. Les extraits cellulaires nous a permis d'analyser les voies de signalisation impliquées dans l'inflammation comme celles des PDE4B, PDE4C, p38- MAPK,  $I_{\kappa}B\alpha$  et  $NF_{\kappa}B$  par des techniques de Western blot et immunocytochimie.

## **II.10 Cultures organoïdes des tissus pulmonaires.**

Des cultures organoïdes de parenchyme, d'explants d'adénocarcinomes pulmonaires humaine, de bronchiole humaine et d'artère pulmonaire ont été réalisées dans du RPMI + Streptomycine/ Pénicilline. Ces techniques de cultures bien maîtrisées dans notre laboratoire servent de modèles d'inflammation *in vitro* (Morin et al., 2005, Guibert et al., 2005). Des petites tranches de parenchyme et d'adénocarcinomes pulmonaires humains ont été mises en culture en conditions contrôles ou en présence de concentrations de 3- 10  $\mu$ M de NCS 613. Les bronches humaines ont été rendues hyper-réactives par des traitements de 48 h avec 10 ng/ml de TNF $\alpha$  dans du RPMI+ 1 % Pénicilline/ Streptomycine, utilisées comme modèle d'inflammation *in vitro* (Morin et al., 2009; Morin et al., 2008) puis traitées ou non avec 3  $\mu$ M de NCS 613. Les artères pulmonaires micro-disséquées de poumon humain ont été cultivées dans du RPMI+ 1 % Pénicilline/ Streptomycine pendant 24h. Des extraits tissulaires sont réalisés à partir de ces cultures organoïdes en homogénéisant ces tissus au Polytron 3 x 30 secondes à 12500 rpm dans le tampon d'homogénéisation : 300 mM saccharose, 20 mM K-PIPES, 3 mM K-EGTA, 0.1 di-isopropylfluorophosphate, 2 dithiothreitol, 1 acide ascorbique, plus 1 pepstatine, 1 leupeptine and 2.5 UI/ml aprotinine, pH 7.4. L'homogénat a été centrifugé à 8000 g et le surnageant aliquoté puis gardé à -80°C.

## **II.11 Mesures de tension mécanique en bain d'organe isolé**

Après la lobectomie, le lobe de poumon a été transporté dans une solution physiologique stérile (saline) au laboratoire de pathologie. La partie du poumon distante de la région cancéreuse a été disséquée par le pathologiste. L'absence d'infiltration tumorale a été établie rétrospectivement dans les bronches par des analyses pathologiques. Les échantillons de tissus ont été immédiatement placés dans la solution de Krebs contenant (en mM): 118 NaCl, 4,7 KCl, 2,5 CaCl<sub>2</sub>, 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2 MgSO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub> et 11,1 dextrose; pH 7,4, préalablement bullée avec 95% O<sub>2</sub> et 5% CO<sub>2</sub> à 22 °C et ensuite immédiatement transportés dans la salle de culture de niveau 2. Des bronchioles humaines distales et des artères pulmonaires ont été aussitôt disséquées, soit fraîchement utilisées pour des mesures de tension mécanique ou mises en culture. Les tensions mécaniques induites par des agonistes spécifiques sont mesurées par la technique des bains d'organes isolés. Les anneaux de bronchioles ou artères pulmonaires sont montés entre deux étriers et placés dans les bains contenant 6 ml de solution de Krebs à 37°C, bullés continuellement avec 95 % d'O<sub>2</sub>, 5 % de CO<sub>2</sub>. Une tension de base de 0,6 g est appliquée aux anneaux. Les tissus ont été équilibrés

pendant 1 h dans la solution Krebs avec des lavages de 15 min d'intervalles. Les tensions passives et actives ont été mesurées en utilisant un système enregistreur (Radnoti Glass Tech., Monrovia, CA) couplé au logiciel Polyview (Grass-Astro-Med Inc, West Warwick, RI) pour faciliter l'acquisition et l'analyses des données.

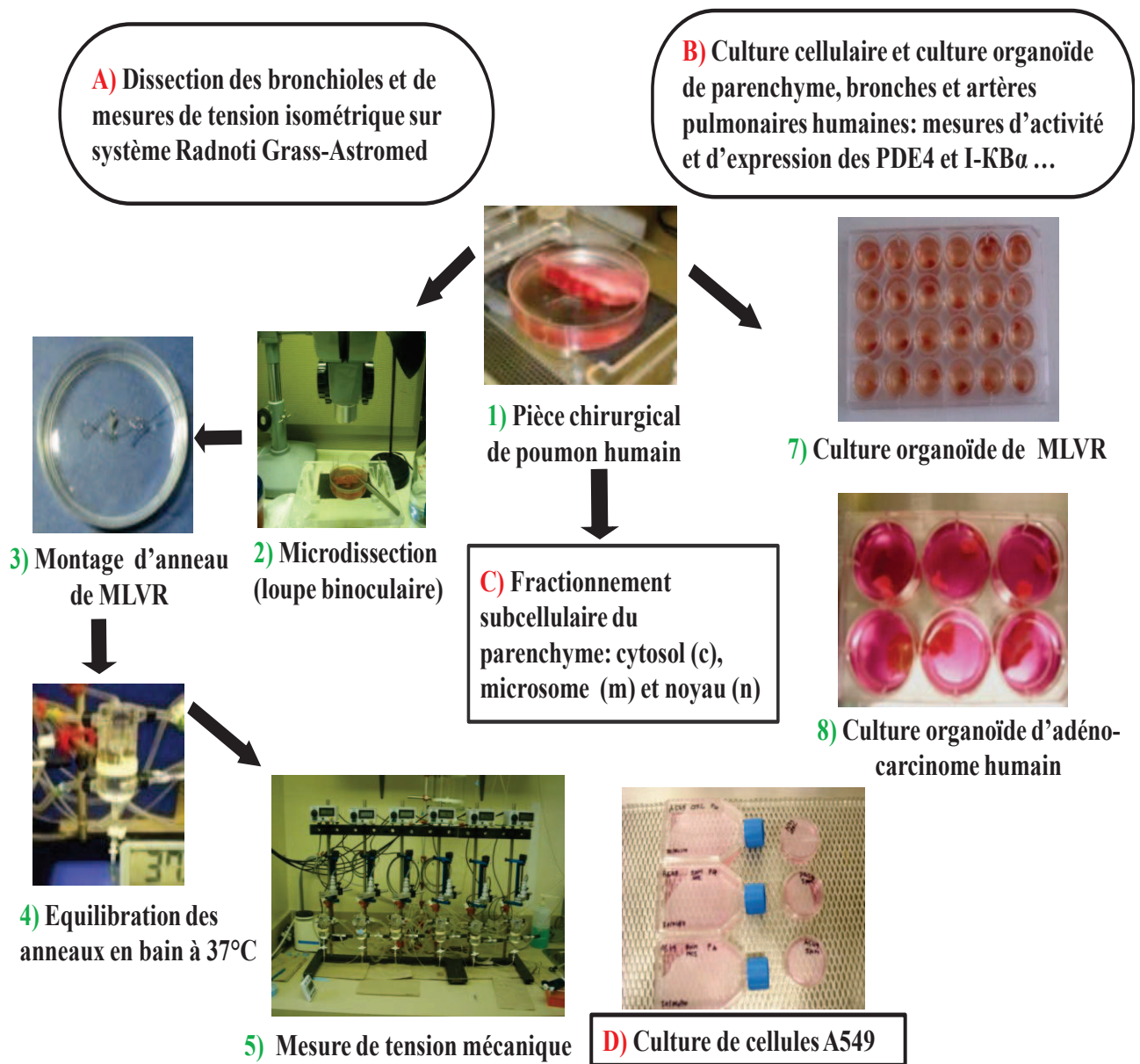
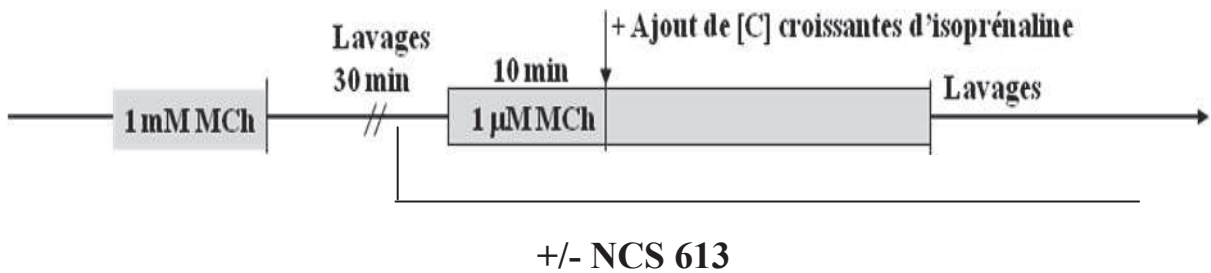


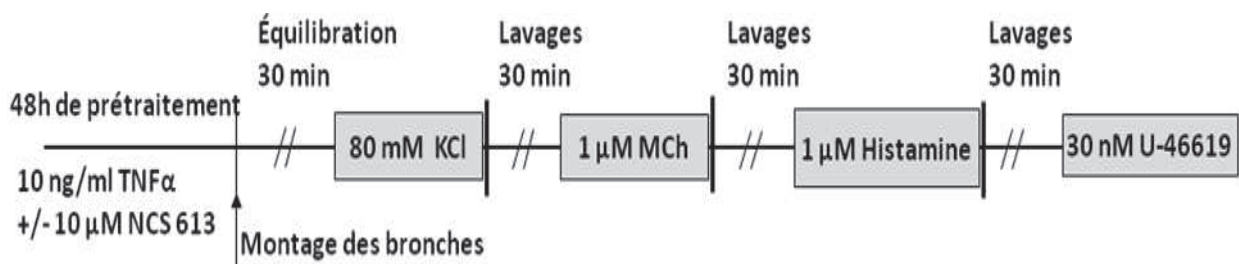
Figure: 17 : Mesure de tension mécanique sur système radnoti Grass et culture organoïde de tissus pulmonaire humaine et cultures des cellules de lignée A549. **A** : les bronchioles humaines ont été microdissequées sous une loupe binoculaire et fraîchement montées en deux étriers. Ce montage est mis dans les bains d'organes isolées contenant du Krebs bullées à 37°C. Les tensions isométriques vis-à-vis d'agonistes (MCh, Histamine et U646619) ont été mesurées. **B** : les bronchioles ont été mis en culture organoïde en présence ou non de TNF $\alpha$  et traitées par le NCS 613 ou non. Le parenchyme pulmonaire qui est un morceau du tissu pulmonaire a été mis en culture organoïde en présence et en l'absence de NCS 613. Les appareils utilisés et la procédure de mesure de tension mécanique sur Système Radnoti Grass-Astromed sont représentés sur cette figure. **C** : Le parenchyme pulmonaire a été homogénéisé, puis fractionné en cytosol, microsome et noyau par des techniques d'ultracentrifugation différentielles.



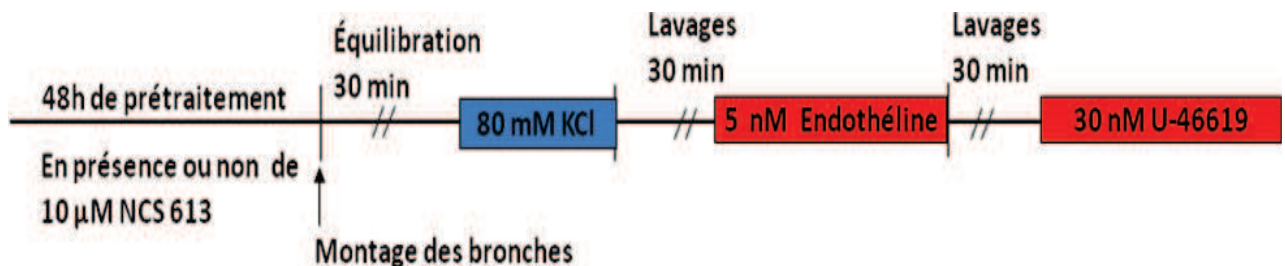
**A) Relaxation des bronchioles à l'isoprénaline en présence de NCS 613.**



**B) Effets du NCS 613 sur l'hyper-réactivité bronchique et des artères pulmonaires.**



**C) Effets du NCS 613 sur la réactivité des artères pulmonaires mis en culture**



**Figure 18. Le protocole de mesure de tension mécanique par la technique de bain d'organe isolé.** A : les bronchioles fraîchement disséquées ont été montées en bain d'organe isolé et après stabilisation ; l'effet relaxant de l'isoprenaline en présence ou non de NCS 613 a été mesuré. B : les tensions pharmaco-mécaniques développées par les bronchioles cultivées en présence de TNF $\alpha$  et traitées au NCS 613 ont été mesurées en présence de 3 agonistes. C : Effets du NCS 613 sur la réactivité des artères pulmonaires mise en culture pendant 72 h ont été mesurées.

### III) RÉSULTATS

#### III.1 Manuscrit 1: Disease progression in MRL/lpr lupus-prone mice is reduced by a specific PDE4 inhibitor

MONNEAUX Fanny<sup>1\*</sup>, KERAVIS Thérèse<sup>2\*</sup>, YOUNGBARE Issaka<sup>2</sup>, GAZI Lucien<sup>2,3</sup>,  
BOURGUIGNON Jean-Jacques<sup>4</sup>, MULLER Sylviane<sup>1#</sup>, and LUGNIER Claire<sup>2#</sup>

##### Mise à contexte

Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie auto-immune d'origine multi-génique, environnementale et immunologique ; présentant un grand polymorphisme clinique (Smyth et al, 2010). Son évolution est marquée par des complications infectieuses et rénales. La forte production de TNF $\alpha$  et d'auto- anticorps est à la base de la morbidité avec des conséquences parfois fatales du fait de la destruction du rein, du cerveau et du cœur (Semerano and Boissier, 2009). Au niveau cellulaire le lupus reste caractérisé par des altérations de signalisation telles que les anomalies d'activation des lymphocytes (Parietti, et al 2008). En aval des récepteurs, les phosphodiesterases des nucléotides cycliques qui hydrolysent spécifiquement l'AMPc, comme les isoformes de PDE4, majoritairement exprimées dans les cellules de l'inflammation sont impliquées dans le contrôle de la réponse inflammatoire (Houslay et al.; 2005, 2010). En effet, l'inflammation est fortement corrélée à un bas taux d'AMPc intracellulaire qui résulte d'une augmentation des activités hydrolytiques des PDE. Le but de ce travail est d'étudier l'effet comparatif de 3 inhibiteurs de PDE4s (Pentoxifylline, Denbufylline et NCS 613) sur la progression du lupus chez la souris MRL/lpr.

##### Contribution des auteurs :

Le Dr Claire LUGNIER et le Pr Muller Sylviane ont supervisé ce travail de recherche et assuré la correction de l'article scientifique. L'équipe de Dr Sylviane MULLER (MONNEAUX Fanny, DECOSSAS Marion, Muller Sylviane) s'est occupé des animaux et de l'administration des inhibiteurs de PDE4 à ces derniers. Dr Thérèse KERAVIS a contribué à la réalisation des Western blots et à l'interprétation des résultats. Pour ma part, j'ai effectué les dosages des activités AMPc-PDEs et PDE4s dans le rein, la rate et le foie des souris.



**Disease progression in MRL/lpr lupus-prone mice is reduced  
by NCS 613, a specific PDE4 inhibitor**

KERAVIS Thérèse<sup>1\*</sup>, MONNEAUX Fanny<sup>2\*</sup>, YOUNGBARE Issaka<sup>1</sup>, GAZI Lucien<sup>1#</sup>,  
BOURGUIGNON Jean-Jacques<sup>3</sup>, MULLER Sylviane<sup>2</sup>, and LUGNIER Claire<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CNRS, Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch, France

<sup>2</sup> CNRS, Immunologie et Chimie Thérapeutiques, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France

<sup>3</sup> CNRS, Laboratoire d'Innovation Thérapeutique, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, Illkirch, France

**Running head:** PDE4 inhibitor slows down lupus progression

**Corresponding author:** Claire Lugnier, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7213, Biophotonique et Pharmacologie, 74 route du Rhin, BP 24, 67401 Illkirch, France. Tel: +33 368 854 264; Fax: +33 368 854 313; E-mail: [claire.lugnier@unistra.fr](mailto:claire.lugnier@unistra.fr)

**Key Words:** Systemic lupus erythematosus; MRL/lpr mouse model; cAMP-PDE; PDE4 activity; PDE4 subtype expression; HARBS; NCS 613; pentoxifylline; denbufylline.

\* Equal contribution

# Current address: Novartis Pharma AG, Oncology BU, CH-4056 Basel, Switzerland

## **Abstract**

Systemic lupus erythematosus is a polymorphic and multigenic inflammatory autoimmune disease. Cyclic AMP modulates inflammation and the inhibition of phosphodiesterase (PDE4) that specifically hydrolyzes cAMP inhibits TNF $\alpha$  secretion. This study was aimed to investigate the evolution of PDE activity and expression levels during the course of the disease in MRL/lpr lupus-prone mice, and to evaluate in these mice the biological and clinical effects of treatments with pentoxifylline, denbufylline and NCS 613 PDE inhibitors. This study reveals that compared to CBA/J control mice, kidney PDE4 activity of MRL/lpr mice increased with the disease progression. Furthermore, it showed that the most potent and selective PDE4 inhibitor NCS 613 was also the most effective molecule in decreasing proteinuria and increasing survival rate of MRL/lpr mice. NCS 613 is a potent ( $IC_{50}=1$  nM) and selective inhibitor for the PDE4C subtype, and its affinity for the High Affinity Rolipram Binding Site (HARBS) is relatively low, making NCS 613 an interesting therapeutic compound since the emetic side effect of most PDE4 inhibitors is related to their strong interaction with HARBS. Finally, as also observed using MRL/lpr PBLs, NCS 613 inhibits basal and LPS-induced TNF $\alpha$  secretion from PBLs of lupus patients, suggesting a therapeutic potential of NCS 613 in systemic lupus.

## Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is a polymorphic and multigenic autoimmune disease that predominantly affects women. The prevalence of lupus in the UK ranges from 40 cases per 100,000 people among northern Europeans to more than 200 cases per 100,000 people in the black population (1). This inflammatory disease is characterized by the presence of anti-double stranded DNA marker antibodies in the serum of patients and by characteristic lupus nephropathy inducing chronic renal failure. There is no specific treatment for this pathology, which is addressed with symptomatic treatments, such as corticoids and immunosuppressors (2, 3).

Cyclic AMP (cAMP) is a key intracellular second messenger, which is an important modulator of inflammation. Downstream receptor activation, intracellular signalling is regulated by cyclic nucleotide phosphodiesterase families (PDE1 to PDE11) that hydrolyze cAMP and cGMP as a feedback mechanism to return to basal levels (4). Among them, the members of the PDE4 family (PDE4A, 4B, 4C and 4D) specifically hydrolyse cAMP and are mainly present in inflammatory cells (5). Studies performed with mice deficient in PDE4B demonstrated that this PDE4 family member plays an essential role in TNF $\alpha$  production by peripheral leukocytes and macrophages (6, 7). Therefore, one could question about the possible participation of PDE4 family members in SLE. This study was designed for investigating the PDE4 expression and activity in MRL/lpr lupus-prone mice and for examining *in vivo* the effects of PDE4 inhibitors on disease progression.

Modifications of cAMP metabolism have been investigated in the kidneys of MRL/lpr lupus-prone mice as the disease progressed by assessing PDE4 activity and expression, PDE4 being the major PDE isozyme regulating cAMP level. The effects of pentoxifylline (8), denbufylline (9, 10) and NCS 613 (11) that differently inhibit PDE4 activity have been studied both *in vivo* in treated animals and *ex vivo*, by testing lipopolysaccharide (LPS)-induced TNF $\alpha$  secretion by peripheral blood lymphocytes (PBLs). NCS 613 effect was also analyzed *ex vivo* on LPS-induced TNF $\alpha$  secretion by PBLs from patients with SLE.

## Results

### *Evolution with disease progression of cAMP-PDE activities in the kidneys of MRL/lpr mice*

cAMP-PDE activities were assessed in the kidneys of MRL/lpr lupus-prone mice at two time points of the disease progression, namely at 8 weeks, before major changes in survival rate, proteinuria and serum anti-double-stranded (ds)DNA antibody levels occur, and at 18 weeks, characterized in this strain by high levels of proteinuria present in 70% of mice and serum anti-dsDNA antibodies occurring in 90% of animals (12). Haplotype-matched CBA/J normal mice of the same age were used as control. The pattern of cAMP-PDE activities in kidney extracts of 8 week-old CBA/J mice shows that cAMP hydrolysis is essentially under the control of PDE4 (66%), while PDE2 and PDE3 contribute for 26% and 8%, respectively (Figure 1). Eight week-old MRL/lpr mice display levels of total cAMP-PDE activity that were similar to those measured in control mice (Figure 2A). In contrast total cAMP-PDE activity levels were increased by 41% ( $p=0.0042$ ) in the kidneys of 18 week-old MRL/lpr lupus-prone mice (Figure 2A). This increase was not due to PDE2 or PDE3 (Figures 2B and 2C) but resulted from PDE4 increase (+30%;  $p=0.0152$ ; Figure 2D). The changes on PDE4 activity were related to disease progression and not due to a simple effect of aging, since no significant alteration was seen between the 8<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup> week in CBA/J controls.

### *Evolution with disease progression of PDE4 protein expression in the kidneys of MRL/lpr mice*

To further explore PDE proteins in MRL/lpr lupus-prone mice, kidney extracts were subjected to SDS-PAGE and PDE proteins were analyzed by Western immunoblotting using kidney extracts from CBA/J mice as control. Figure 3 shows that variants of the four PDE4 subfamilies are expressed at different levels in the kidney extracts of 8 week-old CBA/J control mice (quantification in Table 1). In the kidneys of 8 week-old MRL/lpr mice (L8), however, the expression of several PDE4 variants was significantly altered (Figure 4). Expression of PDE4A-60 kDa protein (increased by 87%,  $P=0.0117$ ; Figure 4A), PDE4B-101 kDa (63% decrease,  $P=0.0092$ ; Figure 4B), PDE4C-81 kDa (knock-down expression,  $P<0.0001$ ; Figure 4C), and PDE4D-72 kDa (33% decrease,  $P=0.0019$ ; Figure 4D) was affected compared to CBA/J kidneys (C8). In 18 week-old MRL/lpr lupus-prone mice (L18), while PDE4A-60 kDa and PDE4B-101 kDa returned to an expression level similar to CBA/J controls (C18), PDE4C-81 kDa protein remained unexpressed ( $P < 0.0001$ ) and PDE4D-72 kDa expression remained significantly decreased (-58%;  $P=0.0081$ ). Again, these effects were not simply linked to aging, since no significant changes were seen between 8 and 18 week-old

CBA/J controls (C8 and C18). Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) expression was stable in all samples (Figure 4E).

#### *Effect of PDE4 inhibitors on disease progression of MRL/lpr mice*

MRL/lpr lupus-prone mice have been treated with PDE inhibitors with different selectivity and specificity toward PDE4, namely pentoxifylline characterized by a lack of PDE isoform selectivity, denbufylline displaying a higher selectivity for PDE4, and NCS 613 characterized by a high selectivity for PDE4 and a strong efficacy (Table 2). MRL/lpr mice were injected intravenously (i.v.) with either 30 µg NCS 613, 100 µg denbufylline, or 100 µg pentoxifylline, or the vehicle only. They were monitored regularly for renal disease (checked by the proteinuria level) and survival. Although no significant effect was seen on the level of DNA antibodies measured in the serum of treated mice, animals that received any of the three PDE4 inhibitors developed a proteinuria level that was significantly lower compared to the control group ( $P < 0.05$ ; Figures 5A, 5B, 5C). NCS 613 was the most effective inhibitor in delaying proteinuria (Figure 5C,  $P = 0.0003$ ). The first mouse that developed proteinuria in the NCS 613 group was 18 week-old while at the same age, around 50% of mice treated with pentoxifylline or denbufylline and 100% of untreated mice had positive proteinuria.

More importantly, the administration of NCS 613 only significantly increased survival of MRL/lpr mice (Figure 5F,  $P = 0.005$ ). Mice treated with NCS 613 started dying later, at 26 weeks vs. 17 weeks in the control group and 22 and 15 weeks in the pentoxifylline (Figure 5D) and denbufylline (Figure 5E) groups, respectively. At 30 weeks, 50% of NCS 613-treated mice were still alive.

#### *Effect of PDE4 inhibitors on LPS-induced TNF- $\alpha$ secretion by PBLs from MRL/lpr mice*

To assess the impact of different PDE4 inhibitors on LPS activation of cytokine responses, PBLs isolated from treated MRL/lpr mice were incubated with 5 µg/mL LPS and the levels of TNF- $\alpha$  were measured in culture supernatants 24h later. As shown in Figure 6, LPS stimulation induced high levels of TNF- $\alpha$  secretion by PBLs from MRL/lpr mice that received vehicle only. Interestingly, LPS-induced TNF- $\alpha$  production was significantly decreased in the cultures of PBLs from MRL/lpr mice treated with PDE4 inhibitors ( $p < 0.05$ ). The calculated inhibition rate of TNF- $\alpha$  secretion was quite equivalent in all groups (51% for pentoxifylline, 70% for denbufylline and 54% for NCS 613) knowing that the dose of NCS 613 (30 µg) was three-fold lower than those of pentoxifylline and denbufylline (100 µg).

#### *Effect of NCS 613 on LPS-induced TNF- $\alpha$ secretion by PBLs from SLE patients*

Figure 7A assesses the effect of NCS 613 on PBLs from SLE patients and shows that 10  $\mu$ M NCS 613 significantly inhibited 70 to 98% of LPS-induced TNF- $\alpha$  production from PBLs originated from SLE patients (SLE1,  $P=0.051$ ; SLE2,  $P=0.005$ ; SLE3,  $P=0.009$ ). NCS 613 also decreased the basal TNF- $\alpha$  secretion level (67% in the case of cells from patient 2,  $P=0.008$ ; Figure 7B).

#### *Determination of NCS 613 $IC_{50}$ value on $^3H$ -rolipram binding site*

Rolipram was the first specific PDE4 inhibitor that was chemically synthesized. Since it was reported that most of rolipram analogs and rolipram itself induce emesis, and that this effect was found to be related to their interaction with the so-called High Affinity Rolipram Binding Site (HARBS; (13-16)), we investigated the capacity of NCS 613 to displace  $^3H$ -rolipram binding on HARBS. While the  $IC_{50}$  value of rolipram toward  $^3H$ -rolipram binding on rat brain membrane was 4 nM, the  $IC_{50}$  value of NCS 613 on HARBS was at least 100 fold less effective, in the order of 500 nM (data not shown), suggesting that NCS 613 may have weaker emetic properties.

#### *Effects of NCS 613 on human recombinant PDE4 subtypes*

The PDE4 family is constituted by PDE4A, PDE4B, PDE4C and PDE4D. As PDE4D knock-out mice develop emesis more easily compared to wild-type mice, it was suggested that PDE4D inhibition favors emesis (17). Therefore, we investigated the subtype PDE4 selectivity of NCS 613 (Table 3). Interestingly, NCS 613 selectively inhibited PDE4C with an  $IC_{50}$  value of 1 nM, and was 14-fold less potent on PDE4D, 43-fold less potent on PDE4A and 50-fold less potent on PDE4B.



## Discussion

The experiments described here in MRL/lpr lupus-prone mice aimed at defining the therapeutic potential of PDE4 inhibitors in this autoimmune disease, which is mainly characterized by nephropathy and inflammatory processes. It is well established that PDE4 inhibitors are anti-inflammatory drugs (15) and that PDE4 inhibitors are beneficial in nephropathy (18), suggesting that PDE4 inhibitors might be helpful for prevention and treatment of SLE.

First, we characterized PDE isozyme profile in renal tissue of normal mice and investigated changes in activity and expression in MRL/lpr mice, a mouse model developing a strong lupus disease. In the kidneys of CBA/J mice, PDE4 was found to be the main contributor of cAMP hydrolytic activity, whereas PDE2 and PDE3, which both hydrolyze cAMP and cGMP, contribute to a lower extent. No change with age in total cAMP-PDE activity was seen in 8 week- and 18 week-old control mice. However, a significant increase (+41%,  $P < 0.001$ ) in total cAMP-PDE activity in 18 week-old MRL/lpr mice was seen that was associated to a significant increase in PDE4 activity (+30%). Western immunoblotting analysis of PDE4 subtypes revealed the presence of multiple variants in PDE4A, PDE4B and PDE4D families and one variant for PDE4C contributing in total PDE4 activity, attesting the preponderant and complex participation of PDE4s in renal functions in which multiple micro-compartmentation of these variants might regulate specific processes (4,19). Changes in PDE4 variant expression were observed in MRL/lpr mice. Thus while PDE4 activity was raised in 18 week-old mice, expression of at least one PDE4 variant in each subtype family was decreased. It should be noticed that since PDE4A-60-kDa, PDE4B-101-kDa and PDE4D-72-kDa represent 24-31% of expressed PDE4A, 4B and 4D variants, a decrease of their expression should contribute only weakly to total PDE4 activity. Interestingly, PDE4C-81-kDa expression was totally abolished in the renal tissue of MRL/lpr mice and this was already observed in young mice. At this stage, it is difficult to raise any conclusion on the possible consequences of this drop of PDE4C-81kDa expression since the contribution of PDE4C into PDE4 activity is considered as minor although it has never been really addressed. It should be noticed that PDE expression does not necessarily reflect PDE protein activity, since some post-translational modifications occur in PDEs, notably PKA-dependent phosphorylation, which might increase PDE4 activity (4, 19, 20). This question is difficult to solve as no potent and selective PDE4 subtype inhibitor allowing assessing PDE4 subtype contribution in PDE4 activity is available (21).

Our data thus show for the first time that in the kidneys of 18 week-old MRL/lpr mice there is a global increase of PDE4 activity. This prompted us to study the therapeutic potential of PDE4 inhibitors in this mouse model of lupus. Three kinds of compound inhibiting PDE4 were chosen: an anti-inflammatory compound, pentoxifylline, delivered on the pharmaceutical market as Torental® that has previously been studied on MRL/lpr mice (22) and mice with 16/6 Id-induced experimental lupus (Segal); denbufylline, a xanthine analog of pentoxifylline known as PDE4 inhibitor with anti-TNF $\alpha$  property (9, 23, 24) and NCS 613, an adenine analogue, designed and synthesized in our laboratory. NCS 613 is a potent and selective inhibitor of PDE4 (11) and it induces *in vivo* and *ex vivo* anti-inflammatory effects (25, 26). The comparison of potencies and selectivities of these compounds showed: i) that pentoxifylline is a poor PDE inhibitor acting in  $10^{-5}$ - $10^{-4}$  molar range concentration with potency order PDE5 $\geq$ PDE3 $\geq$ PDE2=PDE4>PDE1, indicating a better selectivity for PDE5 than for PDE4; ii) that denbufylline, a structural analog of pentoxifylline, acts selectively in the micromolar range concentration on PDE4 and at higher concentration on PDE5 with the rank order PDE4>PDE5>PDE1>PDE2>>PDE3 indicating that little changes in xanthine substituents reverse PDE5 selectivity of pentoxifylline to PDE4 selectivity of denbufylline (7-fold selectivity for PDE4 relatively to PDE5) and increase the inhibitory effect (about 170-fold toward PDE4); and iii) that compared to the other molecules tested, NCS 613 represents the most potent (IC<sub>50</sub> value of 0.042  $\mu$ M; (11)) and selective (112-fold relatively to PDE5 and about 930-fold relatively to PDE1) PDE4 inhibitor.

This study reveals that although denbufylline is a better PDE4 inhibitor than pentoxifylline, the potency of both denbufylline and pentoxifylline to decrease proteinuria (index of nephropathy) was similar ( $P=0.02$  and  $0.006$ , respectively). Noticeably, however, a three-fold lower dose of NCS 613 (30  $\mu$ g) was much more potent to decrease proteinuria ( $P=0.0003$ ). Both the appearance of proteinuria and the half-live of NCS 613-treated mice were significantly delayed. Therefore, in agreement with our previous data obtained in rat kidney with rolipram (18), protective effect of NCS 613 may be linked to its high selectivity and potency for PDE4. This also suggests that not only NCS 613 has a direct effect on cAMP degradation but might also induce long term changes in PDE4 regulation or expression, as previously shown with rolipram (27).

TNF- $\alpha$  secretion that participates to inflammatory processes characterizes lupus progression. Interestingly, denbufylline, pentoxifylline and NCS 613 treatments of MRL/lpr mice significantly decrease LPS-induced TNF $\alpha$   $\square$ secretion measured *ex vivo*. Denbufylline, pentoxifylline and NCS 613 display the same efficacy, keeping in mind that due to its limit of

solubility, NCS 613 was given at a three-fold lower dose than the two other components. NCS 613 (10  $\mu$ M) also significantly decreases LPS-induced TNF $\alpha$  secreted by PBLs from unselected patients with SLE. NCS 613 decreases also by 67% the level of basal TNF $\alpha$  secretion, suggesting that NCS 613 might have some potential in the treatment of human SLE. An important finding in this work was to demonstrate that, in contrast to rolipram, NCS 613 that efficiently controls PDE4 catalytic activity, displays a relatively weak ability to bind HARBS. This result strengthens our previous data showing that NCS 613 does not induce acid gastric secretion, suggesting that NCS 613 induces very low emetic effects (25).

Since we showed that changes in PDE4s occur in murine lupus and that NCS 613 significantly slow-downs lupus development, we questioned whether NCS 613 could affect specific PDE4 subtypes. Our study on recombinant PDE4s reveals that NCS 613 potently (IC<sub>50</sub> value of 1nM) and selectively inhibits PDE4C subtype. Most interestingly NCS 613 targets the PDE4 variant that was found particularly altered in lupus disease, opening a possible avenue for investigations. This low-molecular weight chemical compound (<500Da) presents also the advantage to be easily administrated and was shown to be active *in vivo per os* on inflammation (25).

In conclusion, this study shows for the first time that PDE4 activity is increased in lupus conditions and that among the different PDE4 inhibitors tested, NCS 613, a highly selective PDE4C inhibitor with low emetic properties, significantly prevents disease progression by decreasing proteinuria, lowering *ex vivo* TNF $\alpha$  secretion by PBLs and increasing animal survival rate. NCS 613 also inhibits basal and LPS-induced TNF $\alpha$  secretion by PBLs from SLE patients. Although future investigation is warranted to clarify the exact molecular actions of NCS 613, the present data indicate that NCS 613 might have a potential for treating lupus patients.

## Materials and Methods

### *Materials*

cAMP and cGMP were from Sigma (St. Louis, MO, USA). [ $8\text{-}^3\text{H}$ ] cAMP (25-40 Ci/ mmol; 1 mCi/mL) and [ $8\text{-}^3\text{H}$ ] cGMP (5-15 Ci/ mmol; 1 mCi/mL) were purchased from Perkin Elmer (Courtaboeuf, France) and purified by thin layer chromatography on silica gel, using isopropanol/ $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$  (70/15/15) as a solvent (27). Tritiated rolipram (23 Ci/mmol; 5 mCi/mL) was a gift from Celltech Therapeutics Society (Slough, UK). Calmodulin was purified from bovine brain as described (28). Denbufylline and pentoxifylline were generous gifts from Beecham-Wulffing (Gronau, Germany) and Hoechst (Puteaux, France), respectively. Cilostamide, rolipram and NCS 613 were synthesized as described previously (11, 29, 30). Anti-PDE4A (AC55) and anti-PDE4B (K118) antibodies (31) were a gift of Dr Marco Conti (Stanford University, USA). Anti-PDE4C (PD4-301AP) and anti-PDE4D (PD4-401AP) antibodies were from FabGennix (Frisco, TX, USA) and anti-GAPDH antibody was from Chemicon (Billerica, MA, USA). Horseradish peroxidase-conjugates were from Promega (Charbonnières-les-Bains, France). ECL kit was from GE Healthcare (Orsay, France).

### *Animals*

Female CBA/J (H-2<sup>k</sup>) and MR/lpr (H-2<sup>k</sup>) mice were purchased from Harlan (Gannat, France). All animal experiments were performed with the approval of the local Institutional Animal Care and Use Committee (CREMEAS).

### *SLE Patients*

Blood samples were obtained from three unselected patients with SLE. The latter fulfilled the American College of Rheumatology criteria for the disease. They were recruited from the Strasbourg University Hospital Center of Hautepierre after informed consent was obtained. Patients were treated by low doses (median dose 10 mg; range 0-20 mg) of methotrexate, hydroxychloroquine and/or non-steroid anti-inflammatory drugs.

### *Treatment of lupus-prone mice with PDE inhibitors*

Five week-old female MRL/lpr mice received either pentoxifylline (100  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ; 10 mice), or denbufylline (100  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ; 10 mice), or NCS 613 (30  $\mu\text{g}/\text{mouse}$ ; 8 mice) in 100  $\mu\text{L}$  PBS-10% ethanol via the i.v. route. In these conditions, NCS 613 was not soluble at 100  $\mu\text{g}/100\mu\text{L}$ .

Control group (10 mice) received 100  $\mu$ L PBS-10% (v/v) ethanol intravenously. These administrations were repeated twice at 2 week intervals and again four weeks later. All mice were monitored regularly for different clinical and biological parameters over 26 weeks. Measurements of outcome included the evaluation of survival and proteinuria measured on a fresh urine sample using Albutix (Bayer Diagnostics, Basingstoke, UK).

#### *Measurement of LPS-induced TNF- $\alpha$ secretion by PBLs from MRL/lpr mice*

Blood samples was pooled from groups of seven 14 week-old treated mice. PBLs were purified by density separation (Lympholyte-M, d=1.0875; Cedarlane, Hornby, Canada), washed three times, and resuspended at  $5 \times 10^6$  cells/ml in L-alanyl-L-glutamine-enriched RPMI 1640 medium (Cambrex, Verviers, Belgium) containing 10% (v/v) fetal calf serum (Dutscher, Brumath, France), HEPES, gentamycin and b-mercaptoethanol. They were cultured in duplicate using  $5 \times 10^5$  cells/well in the presence of 5  $\mu$ g/mL LPS from E. coli. Culture supernatants were collected after 24h and stored frozen at  $-20^\circ\text{C}$ . TNF- $\alpha$  levels were determined using a double-sandwich ELISA (PharMingen, San Diego, CA; detection limit 30 pg/mL) according to the manufacturer's instructions.

#### *Measurement of TNF- $\alpha$ secreted by PBLs from SLE patients*

PBLs were isolated by centrifugation on Ficoll-Histopaque (Sigma-Aldrich) and cultured as described above using  $5 \times 10^5$  cells/well. PBLs were incubated for 45 min with or without 10  $\mu$ M NCS 613, then stimulated or not with 5  $\mu$ g/mL LPS. Culture supernatants were collected 24h later and stored frozen at  $-20^\circ\text{C}$  before TNF- $\alpha$  level determination, as described above.

#### *Preparation of kidney extracts*

CBA/J and MRL/lpr mice were sacrificed by cervical dislocation at 8 and 18 weeks. Kidneys were isolated, immediately frozen in liquid  $\text{N}_2$  and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Frozen kidneys were powdered-ground in liquid nitrogen using a mortar/pestle set-up. The resulting tissue-powders were homogenized with a glass-glass potter for 3x30 sec at  $4^\circ\text{C}$  in the following buffer: 20 mM Tris, pH 7.5, 5 mM EGTA, 150 mM NaCl, 20 mM Na  $\beta$ -glycerophosphate, 1  $\mu$ M H-89, 10 mM NaF, 1 mM  $\text{NaVO}_3$ , 1% (v/v) Triton X-100, 0.1% (v/v) Tween 20, 166  $\mu$ M Pefabloc, 133  $\mu$ M aprotinin, 8.3  $\mu$ M bestatin, 2.5  $\mu$ M E64, 3.3  $\mu$ M leupeptin and 1.6  $\mu$ M pepstatin A. The homogenates were centrifuged at 14,000 g for 10 min at  $4^\circ\text{C}$  and the supernatants were stored as aliquots at  $-80^\circ\text{C}$  until used. Protein concentration was determined following Lowry et al. (32) using a compatible detergent assay.

#### *Measurement of PDE activity in kidney extracts*

PDE activity was determined with a radioenzymatic assay as described previously (27). Total cAMP-PDE activity was assessed at 1  $\mu\text{M}$  cAMP and the contribution of PDE isozymes was determined by using selective inhibitors, 1  $\mu\text{M}$  cilostamide for PDE3 and 10  $\mu\text{M}$  rolipram for PDE4, the residual cAMP-PDE activity representing essentially PDE2. Specific activities were expressed as  $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$  protein.

#### *Analysis of protein expression pattern of PDE4*

Proteins (30  $\mu\text{g}$ ) from kidney extracts were subjected to Western immunoblotting as described previously (26). Briefly, protein samples were denatured and solubilized for 5 min at 95°C in Laemmli buffer, subjected to electrophoresis on SDS-8% polyacrylamide gel and electrotransferred onto polyvinylidene fluoride membranes. Immunodetection was carried out with anti-PDE4A (AC55; 1/2,000), anti-PDE4B (K118; 1/2,000), anti-PDE4C (PD4-301AP; 1/2,500), anti-PDE4D (PD4-401AP; 1/2,500), and anti-GAPDH (1/60,000) antibodies. Immobilized antigens were detected by chemiluminescence using horseradish peroxidase-labelled secondary antibodies (1/60,000), an ECL kit and autoradiography films. Autoradiography signals were captured on a GeneGenius Bio Imaging System (Syngene/Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France) using the GeneSnap software and analyzed using the GeneTools software (Syngene/Ozyme).

#### *Measurement of $IC_{50}$ on purified PDE isoforms*

PDE1, PDE3, PDE4 and PDE5 were isolated by anion exchange chromatography from bovine aortic smooth muscle cytosolic fraction (33). PDE2 was isolated from human platelets following the method described in (34, 35). Purified PDEs were stored as small aliquots at -80°C until use. PDE activity was determined at a substrate concentration of 1  $\mu\text{M}$  cAMP or cGMP in the presence of 10,000 cpm [ $^3\text{H}$ ]-cAMP or -cGMP as tracers. PDE1 activity was assessed at 1  $\mu\text{M}$  cGMP in calmodulin-activated state (18 nM calmodulin with 10  $\mu\text{M}$   $\text{CaCl}_2$ ). PDE2 activity was assessed at 1  $\mu\text{M}$  cAMP in activated state (+ 5  $\mu\text{M}$  cGMP), and PDE3 and PDE4 activities were assessed at 1  $\mu\text{M}$  cAMP in the presence of 1 mM EGTA. To prevent reciprocal cross-contamination between PDE3 and PDE4, the assays were carried out in the presence of 50  $\mu\text{M}$  rolipram for PDE3 or 50  $\mu\text{M}$  cGMP for PDE4. PDE5 activity was measured at 1  $\mu\text{M}$  cGMP in the presence of 1 mM of EGTA. Denbufylline, pentoxifylline and NCS 613 were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). The final concentration of DMSO



did not exceed 1% (v/v) for PDE activity assessment. This concentration of DMSO had no effect when tested in control preparation. NCS 613 IC<sub>50</sub> values were also determined on human recombinant PDE4A, PDE4B, PDE4C and PDE4D kindly given by Ted J. Torphy (SmithKline Beecham Pharmaceuticals, King of Prussia, PA, USA).

The concentration of compounds that produced 50% inhibition of substrate hydrolysis (IC<sub>50</sub>) was calculated by non-linear regression analysis (GraphPad Prism, San Diego, CA) of concentration-response curves including at least 6 different concentrations of inhibitors.

### *<sup>3</sup>H-rolipram binding assay*

Binding assays were performed with a modification of the method of Schneider et al. (35). The assay was done in 50 mM TES/NaOH buffer, pH 7.6, containing 10 mM Mg Cl<sub>2</sub>, 0.1 M NaCl and 100 μM 5'AMP. The final volume of reaction mixture was 400 μL containing 4 nM <sup>3</sup>H-rolipram. For saturation binding, the concentration of <sup>3</sup>H-rolipram ranged from 0.3 to 12 nM. Non-specific binding was determined in the presence of 1 μM unlabeled rolipram in the incubation medium. Binding studies were started by the addition of 100 μL of rat brain aliquots (0.9 mg protein/mL) to the reaction mixture and conducted at 23°C for 1h under agitation and stopped by the addition of 3 mL of ice-cold reaction buffer and rapid vacuum filtration through Whatman GF/B filters that have been soaked in 0.3 % (v/v) polyethylenimine. The filters were washed twice with 3ml of ice-cold reaction buffer without 5'AMP, dried and counted by liquid scintillation. Non-specific binding was consistently lower than 20% of the specific binding.

### *Statistical analysis*

PDE data and TNF-α secretion data were analyzed with the Student's *t*-test for unpaired data. Survival data were analyzed by the Kaplan-Meier product-limit method, with analysis by log rank test. Significance was defined as  $P \leq 0.05$ .

### **Acknowledgments**

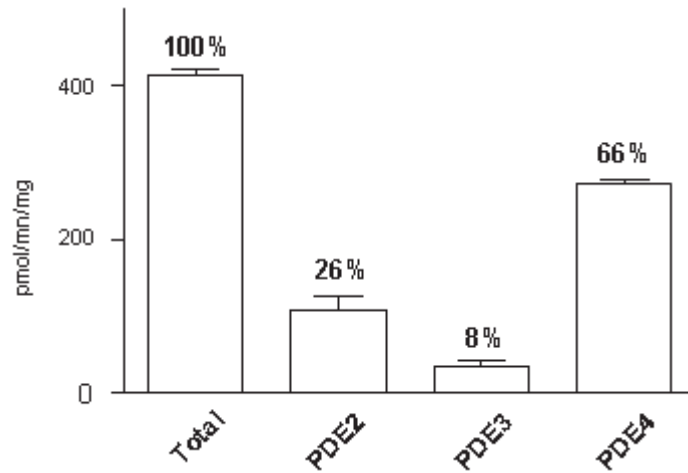
We are grateful to Dr Marco Conti from Stanford University, USA, for providing us with AC55 and K118 antibodies, To Dr Ted J. Torphy, from SmithKline Beecham Pharmaceuticals, King of Prussia, PA, USA, for providing human PDE4 subtypes, to Pr Jean Sibia from Strasbourg University Hospital Center of Hautepierre for access to lupus patients' samples, to Monique Duval and H el ene Justiniano for technical assistance.

## References

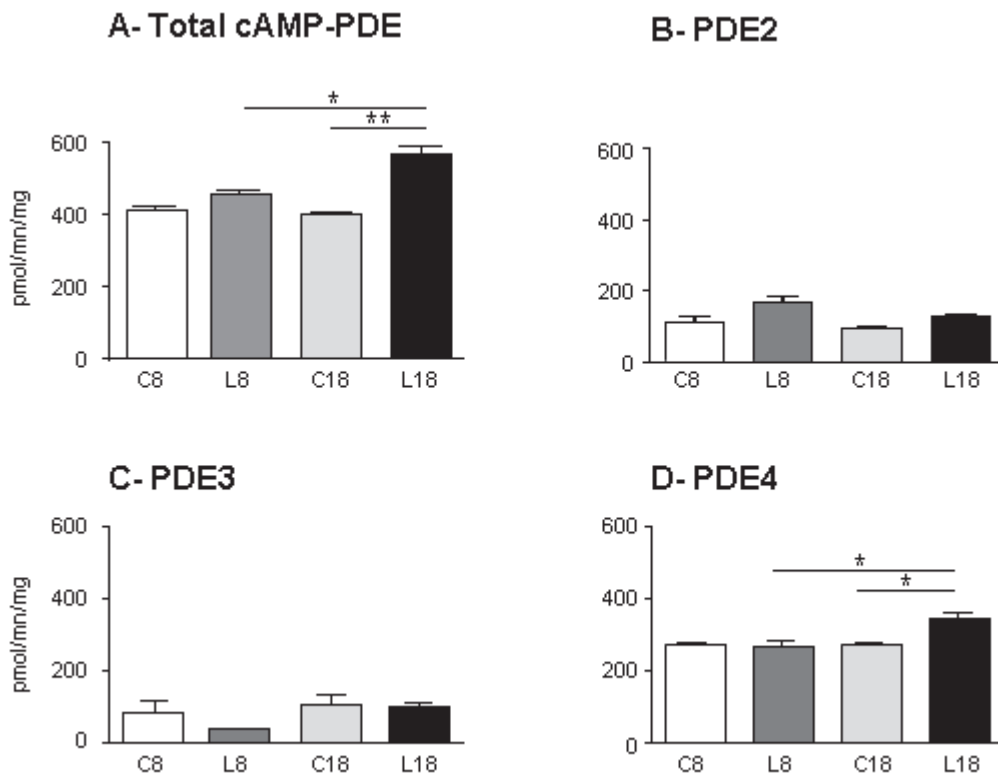
1. Johnson AE, Gordon C, Palmer RG, Bacon PA. The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth. *Arthritis Rheum.* 1995;38(4):551-558.
2. Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2008;358(9):929-939.
3. Monneaux F., Muller S. Molecular therapies for systemic lupus erythematosus: clinical trials and future prospects. *Arthritis Res Therapy.* 2009;11(3):234.
4. Lugnier C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacol Ther.* 2006;109(3):366-398.
5. Tenor H, Schudt C. Analysis of PDE isoenzyme profiles in cells and tissues by pharmacological methods. In : Phosphodiesterase inhibitors. Christian Schudt, Gordon Dent and Klaus F. Rabe Eds. The Handbook of Immunopharmacology, Clive Page, series Ed. 1996, p.p. 21-40.
6. Jin SL, Conti M. Induction of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4B is essential for LPS-activated TNF-alpha responses. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002;99(11):7628-7633.
7. Jin SL, Lan L, Zoudilova M, Conti M. Specific role of phosphodiesterase 4B in lipopolysaccharide-induced signaling in mouse macrophages. *J Immunol.* 2005;175(3):1523-1531.
8. Nandi JS, Nair KG, Deo S. Inhibition cAMP-phosphodiesterase in the rat heart by pentoxifylline--a new xanthine derivative. *Adv Myocardiol.* 1980;1:359-365.
9. Wilke R, Arch JR, Nicholson CD. Tissue selective inhibition of cyclic nucleotidephosphodiesterase by denbufylline. *Arzneimittelforschung.* 1989;39(6):665-667.
10. Komasa N, Lugnier C, Stoclet JC. Endothelium-dependent and independent relaxation of the rat aorta by cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors. *Br J Pharmacol.* 1991;104(2):495-503.
11. Bourguignon JJ, Désaubry L, Raboisson P, Wermuth CG, Lugnier C. 9-Benzyladenines: potent and selective cAMP phosphodiesterase inhibitors. *J Med Chem.* 1997;40(12):1768-1770.
12. Monneaux F, Lozano JM, Patarroyo ME, Briand J-P, Muller S. T cell recognition and therapeutic effects of a phosphorylated synthetic peptide of the 70K snRNP protein administered in MRL/lpr lupus mice. *Eur J Immunol.* 2003;33(2):287-296.
13. Barnette MS, Grous M, Cieslinski LB, Burman M, Christensen SB, Torphy TJ. Inhibitors of phosphodiesterase IV (PDE IV) increase acid secretion in rabbit isolated gastric glands:

- correlation between function and interaction with a high-affinity rolipram binding site. *J Pharmacol Exp Ther.* 1995;273(3):1396-1402.
14. Souness JE, Rao S. Proposal for pharmacologically distinct conformers of PDE4 cyclic AMP phosphodiesterases. *Cell Signal.* 1997;9(3-4):227-236.
  15. Houslay MD, Schafer P, Zhang KY. Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discov Today.* 2005;10(22):1503-1519.
  16. Houslay MD, Adams DR. Putting the lid on phosphodiesterase 4. *Nat Biotechnol.* 2010;28(1):38-40.
  17. Robichaud A, Stamatou PB, Jin SL, Lachance N, MacDonald D, Laliberté F, Liu S, Huang Z, Conti M, Chan CC. Deletion of phosphodiesterase 4D in mice shortens alpha(2)-adrenoceptor-mediated anesthesia, a behavioral correlate of emesis. *J Clin Invest.* 2002;110(7):1045-52.
  18. Ahloulay M, Bankir L, Lugnier C, Le Bec A, Poirel O, Moreau R, Lebrec D. Cyclic AMP-phosphodiesterases inhibitor improves sodium excretion in rats with cirrhosis and ascites. *Liver Int.* 2005;25(2):403-409.
  19. Houslay MD. Underpinning compartmentalized cAMP signalling through targeted cAMP breakdown. *Trends Biochem Sci.* 2010;35(2):91-100.
  20. Conti M, Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem.* 2007;76:481-511.
  21. Wang H, Peng MS, Chen Y, Geng J, Robinson H, Houslay MD, Cai J, Ke H. Structures of the four subfamilies of phosphodiesterase-4 provide insight into the selectivity of their inhibitors. *Biochem J.* 2007;408(2):193-201.
  22. Hecht M, Müller M, Lohmann-Matthes ML, Emmendorffer A. In vitro and in vivo effects of pentoxifylline on macrophages and lymphocytes derived from autoimmune MRL-lpr/lpr mice. *J Leukoc Biol.* 1995;57(2):242-249.
  23. Muller B, Lugnier C, Stoclet JC. Involvement of rolipram-sensitive cyclic AMP phosphodiesterase in the regulation of cardiac contraction. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1990;16(5):796-803.
  24. Reimund JM, Raboisson P, Pinna G, Lugnier C, Bourguignon JJ, Muller CD. Anti-TNF-alpha properties of new 9-benzyladenine derivatives with selective phosphodiesterase-4-inhibiting properties. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;288(2):427-434.
  25. Boichot E, Wallace JL, Germain N, Corbel M, Lugnier C, Lagente V, Bourguignon JJ. Anti-inflammatory activities of a new series of selective phosphodiesterase 4 inhibitors derived from 9-benzyladenine. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;292(2):647-653.

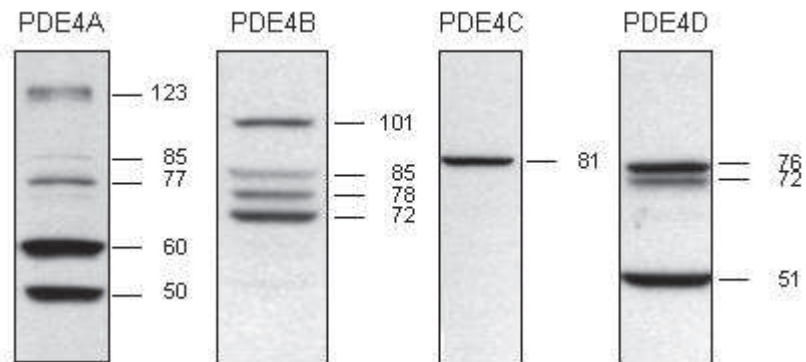
26. Barreto EO, Carvalho VF, Lagente V, Lugnier C, Cordeiro RS, Martins MA, E Silva PM. Increased levels of cyclic adenosine monophosphate contribute to the hyporesponsiveness of mast cells in alloxan diabetes. *Int Immunopharmacol.* 2004;4(6):755-762.
27. Campos-Toimil M, Keravis T, Orallo F, Takeda K, Lugnier C. Short-term or long-term treatments with a phosphodiesterase-4 (PDE4) inhibitor result in opposing agonist-induced Ca(2+) responses in endothelial cells. *Br J Pharmacol.* 2008;154(1):82-92.
28. Keravis T, Thaseldar-Roumié R, Lugnier C. Assessment of phosphodiesterase isozyme contribution in cell and tissue extracts. *Methods Mol Biol.* 2005;307:63-74.
29. Follénus A, Gérard D. Fluorescence investigations of calmodulin hydrophobic sites. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984;119(3):1154-1160.
30. Lugnier C, Bruch M, Stoclet JC, Strub MP, Marivet M, Wermuth CG. Substituted carbostyrils as inhibitors of cyclic AMP phosphodiesterase. *Eur J Med Chem.* 1985;20:121-125.
31. Marivet MC, Bourguignon JJ, Lugnier C, Mann A, Stoclet JC, Wermuth CG. Inhibition of cyclic-adenosine-3',5'-monophosphate phosphodiesterase from vascular smooth muscle by rolipram analogues. *J Med Chem.* 1989;32(7):1450-1457.
32. Richter W, Jin SL, Conti M. Splice variants of the cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE4D are differentially expressed and regulated in rat tissue. *Biochem J.* 2005;388(Pt 3):803-11.
33. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-275.
34. Lugnier C, Schoeffter P, Le Bec A, Strouthou E, Stoclet JC. Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. *Biochem Pharmacol.* 1986;35(10):1743-1751.
35. Kameni Tcheudji JF, Lebeau L, Virmaux N, Maftai CG, Cote RH, Lugnier C, Schultz P. Molecular organization of bovine rod cGMP-phosphodiesterase 6. *J Mol Biol.* 2001;310(4):781-791.
36. Schneider HH, Schmiechen R, Brezninski M, Seidler J. Stereospecific binding of the antidepressant rolipram to brain protein structures. *Eur J Pharmacol.* 1986;127(1-2):105-115.



**Figure 1. Pattern of cAMP-PDE activities in the kidneys of 8 week-old CBA/J control mice.** cAMP-PDE specific activities in total homogenate and contribution of PDE2, PDE3 and PDE4 were assessed as described in the Methods section. Data are expressed as pmol/min/mg of protein and are the mean  $\pm$  s.e.m. of the data obtained from three individual mice.

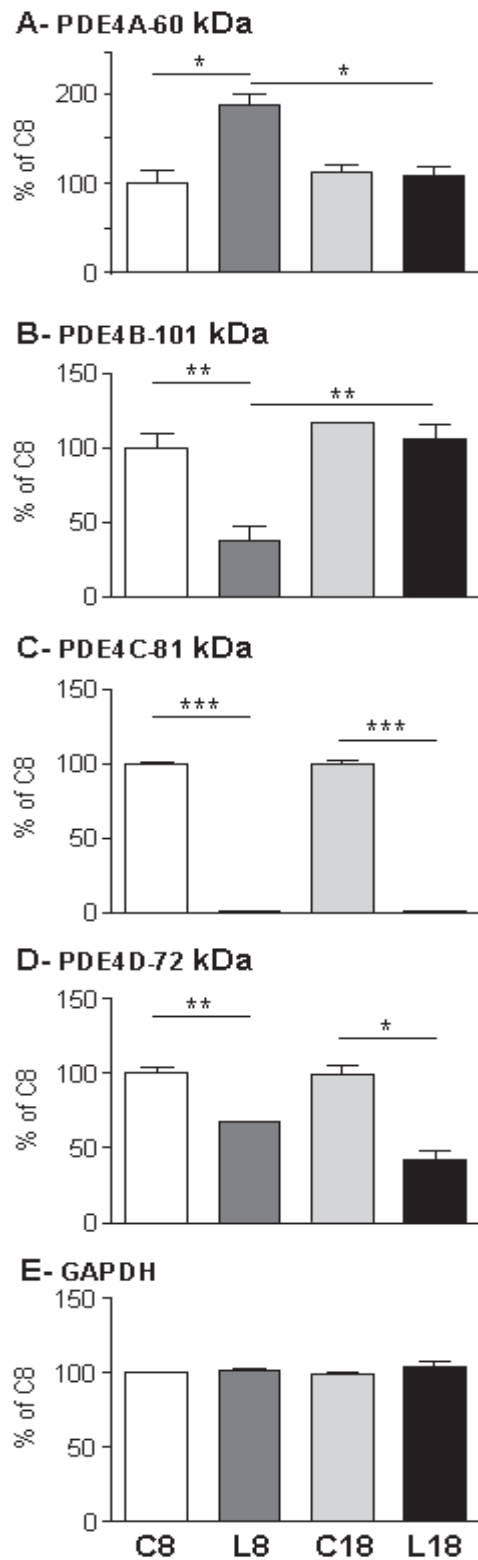


**Figure 2. Evolution with the disease of cAMP-PDE activities in the kidneys of MRL/lpr mice.** cAMP-PDE specific activities in total homogenate (A) and contribution of PDE2, PDE3 and PDE4 (B-D) were assessed on 8 week-old (C8) and 18 week-old (C18) CBA/J control mice and 8 week-old (L8) and 18 week-old (L18) MRL/lpr mice as described in the Methods section. Data are expressed as pmol/min/mg of protein and are the mean  $\pm$  s.e.m. of the data obtained from three individual mice. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .

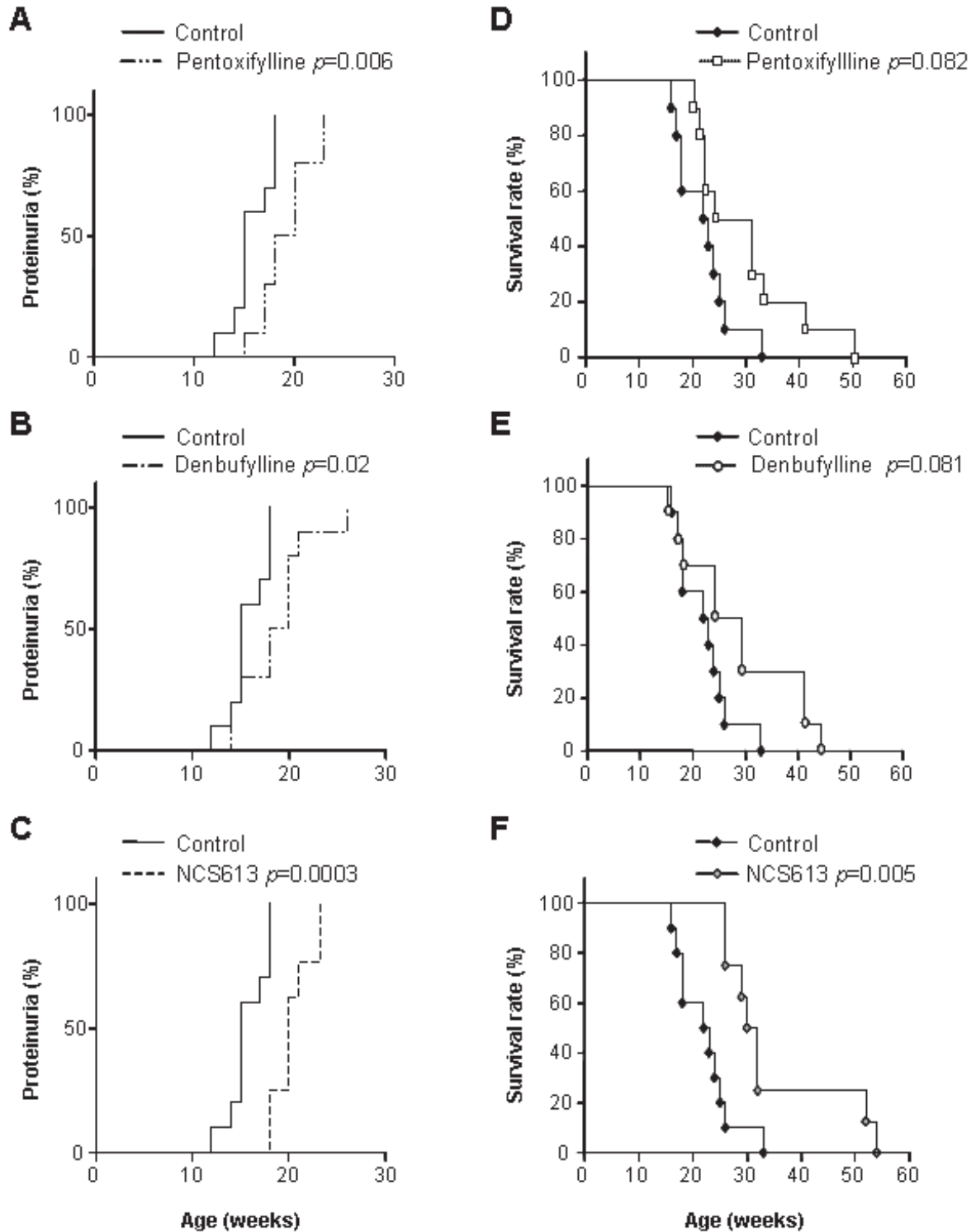


**Figure 3. Protein expression pattern of PDE4 in the kidneys of 8 week-old CBA/J control mice.** PDE4A, PDE4B, PDE4C, and PDE4D protein expression was assessed on 8 week-old CBA/J control mice as described in the Methods section. The apparent size of protein bands is expressed in kDa.

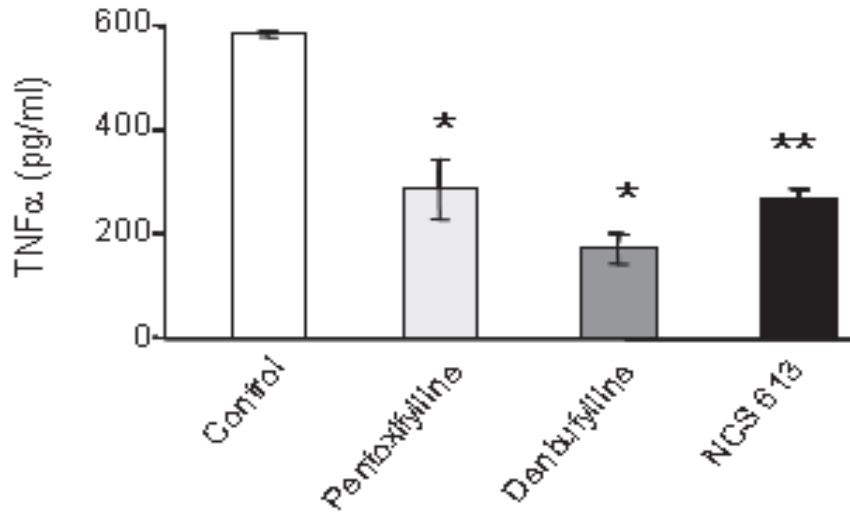




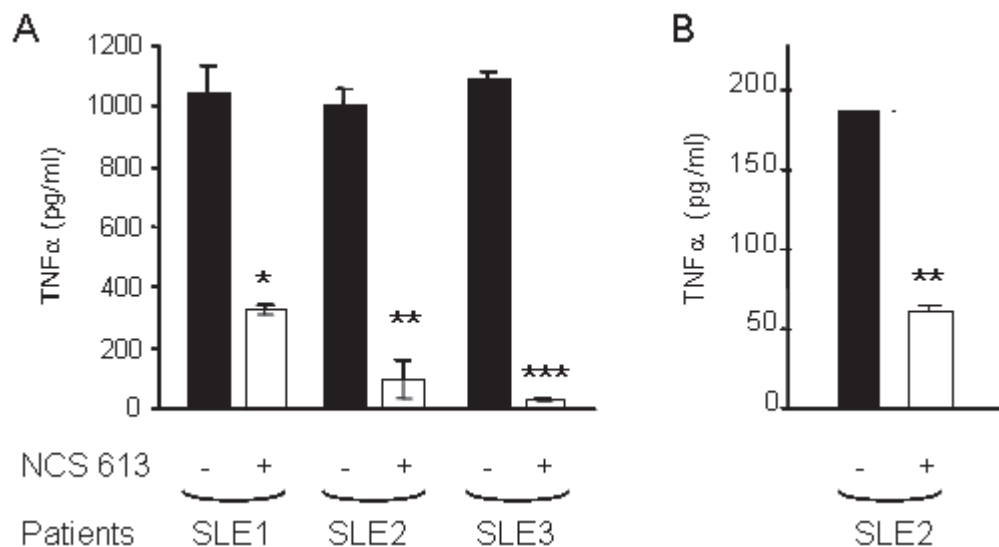
**Figure 4. Protein expression pattern of PDE4 in the kidneys of MRL/lpr mice of 8 and 18 weeks.** PDE4A, PDE4B, PDE4C, PDE4D and GAPDH protein expression were assessed on 8 week-old (C8) and 18 week-old (C18) CBA/J control mice and 8 week-old (L8) and 18 week-old (L18) MRL/lpr mice. Data are expressed as the % of C8 and are the mean  $\pm$  s.e.m. of three mice. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ .



**Figure 5. Effect of pentoxifylline, denbufylline and NCS 613 treatments on proteinuria and survival rate of MRL/lpr mice.** Four groups of MRL/lpr mice were injected via the i.v. route at 5, 7, 9 and 13 weeks with either 100  $\mu$ L of PBS-10% ethanol (control, n=10), or 100  $\mu$ g pentoxifylline in 100  $\mu$ L PBS-10% ethanol (n=10), or 100  $\mu$ g denbufylline in 100  $\mu$ L PBS-10% ethanol (n=10), or 30  $\mu$ g NCS 613 in 100  $\mu$ L PBS-10% ethanol (n=8). Proteinuria was measured as described in the Methods section and the results represent the percentage of mice that display severe proteinuria (>3g/L). Survival rate is expressed as the percentage of surviving mice with time expressed in weeks.



**Figure 6. Effect of pentoxifylline, denbutyrylline and NCS 613 treatments on *ex vivo* LPS-induced TNF- $\alpha$  secretion by PBLs from MRL/lpr mice.** Four groups of 7 MRL/lpr mice each were injected i.v. at 5, 7, 9 and 13 weeks with either 100  $\mu$ L of PBS-10% ethanol (control), or 100  $\mu$ g pentoxifylline in 100  $\mu$ L PBS-10% ethanol, or 100  $\mu$ g denbutyrylline in 100  $\mu$ L PBS-10% ethanol, or 30  $\mu$ g NCS 613 in 100  $\mu$ L PBS-10% ethanol. Blood samples were collected from 14 week-old treated mice. PBLs pooled from seven mice of each group were purified and cultured in the presence of LPS, and TNF- $\alpha$  secretion was determined by ELISA 24h later. The results are expressed as the mean concentration (pg/mL)  $\pm$  s.e.m. of duplicate cultures. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ .



**Figure 7. Effect of NCS 613 on LPS-induced and basal TNF- $\alpha$  secretion by PBLs from SLE patients.** PBLs from three patients with SLE (SLE1, SLE2 and SLE3) were purified and cultured as described in Materials and Methods. PBLs were incubated for 45 min with ( $\square$ ) or without ( $\blacksquare$ ) 10  $\mu$ M of NCS 613 and stimulated (A; SLE1, SLE2 and SLE3) or not (B; SLE2) with 5  $\mu$ g/mL of LPS. TNF- $\alpha$  secretion was tested by ELISA. The results are expressed as the mean concentration (pg/mL)  $\pm$  s.e.m. of duplicate cultures. There was no basal TNF- $\alpha$  secretion in the culture of PBMCs from the two other SLE patients 1 and 3.

**Table 1. Distribution of PDE4A, PDE4B, PDE4C and PDE4D variants in the kidneys of 8 week-old CBA/J control mice**

PDE4A		PDE4B		PDE4C		PDE4D	
kDa	%	kDa	%	kDa	%	kDa	%
123	16.6±1.0	101	29.1±1.1	81	99.9±0.7	76	32.8±1.7
85	6.5±0.9	78	12.8±0.5			72	24.5±0.7
77	17.5±0.5	85	20.8±0.3			51	42.6±1.5
60	30.7±0.5	72	37.2±1.6				
50	28.5±1.4						

Data are expressed as the % of the sum of all signals expressed in one subfamily and represent the mean ± s.e.m. of three independent experiments.

**Table 2. IC<sub>50</sub> (µM) values for denbufylline, pentoxifylline and NCS 613 on PDE1-PDE5 isozymes.**

Isozyme	PDE1	PDE2	PDE3	PDE4	PDE5	PDE5/PDE4
Substrate	cGMP	cAMP	cAMP	cAMP	cGMP	
Modulator	CaM	cGMP				
<b>Pentoxifylline</b>	236 ± 20	119 ± 10	84 ± 7	135 ± 11	74 ± 6	0.55
<b>Denbufylline</b>	133 ± 11	208 ± 19	>300	0.76 ± 0.05	5.4 ± 0.5	7.11
<b>NCS 613</b>	39 ± 2	24 ± 3	> 300	0.042 ± 0.003	4.7 ± 0.1	111.9

IC<sub>50</sub> values were determined at 1 µM substrate concentration in the presence of the modulator for PDE1 and PDE2 and represent the mean ± s.e.m. of three independent experiments. CaM = calmodulin.

**Table 3. IC<sub>50</sub> (nM) values for NCS 613 on human recombinant PDE4 subtypes**

Isozyme	PDE4A	PDE4B	PDE4C	PDE4D
<b>NCS 613</b>	43	50	1	14

IC<sub>50</sub> values were determined at 1 µM substrate concentration and represent the mean of 2 independent experiments.

### **III.2 Manuscrit 2 : Effect of NCS 613, a specific PDE4 inhibitor, on cAMP, PDE4s regulations and on immune complexes in kidney from MRL/lpr lupus- prone mice.**

**Mise en contexte :**

Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie auto-immune d'origine multi-génique, environnementale et immunologique ; présentant un grand polymorphisme clinique (Smyth et al, 2010). Son évolution est marquée par des complications infectieuses et rénales. Le lupus évolue sous forme de maladie inflammatoire chronique avec des atteintes de multiples organes. Cependant, le lupus néphrétique reste de loin la manifestation commune la plus sévère, caractérisée par le dépôt de complexes immuns dans le rein (Liu, et al 2010). L'insuffisance rénale représente le stade le plus ultime du LED, assombrissant le pronostic vital du patient. La forte production de TNF $\alpha$  et d'auto- anticorps est à la base de la morbidité avec des conséquences parfois fatales du fait de la destruction du rein, du cerveau et du cœur (Semerano and Boissier, 2009). Au niveau cellulaire le lupus reste caractérisé par des altérations de signalisation tellesque; les anomalies d'activation des lymphocytes (Parietti, et al 2008). En aval des récepteurs, Les phosphodiesterases des nucléotides cycliques qui hydrolysent spécifiquement l'AMPc, comme les isoformes de PDE4, majoritairement exprimées dans les cellules de l'inflammation sont impliquées dans le contrôle de la réponse inflammatoire (Houslay et al. ; 2005, 2010). Ce travail fait suite à un dépôt de brevet effectué de notre laboratoire en collaboration avec l'équipe de Sylviane Muller, montrant qu'un inhibiteur spécifique de PDE4, le NCS 613 ralentit la progression du lupus chez la souris MRL/lpr (voir manuscrit 1). Le but de ce travail est d'étudier le rôle des PDE4 et les conséquences de leur inhibition dans l'inflammation chronique dans ces souris.

#### **Contribution des auteurs :**

Le Dr Claire LUGNIER a supervisé ce travail de recherche et assuré la correction de l'article scientifique. L'équipe de Dr Sylviane MULLER (MONNEAUX Fanny, DECOSSAS Marion, Muller Sylvian) s'est occupé des animaux et de l'administration du NCS 613 à ces derniers. Dr Thérèse KERAVIS a contribué à l'encadrement scientifique et à l'interprétation des résultats. Pour ma part, j'ai réalisé les différentes expériences et rédigé l'article scientifique.

**Effect of NCS 613, a specific PDE4 inhibitor, on cAMP, PDE4s regulations and on immune complexes in kidney from MRL/lpr lupus- prone mice.**

**YOUGBARE Issaka<sup>1</sup>, KERAVIS Thérèse<sup>1</sup>, MONNEAUX Fanny<sup>2</sup>, MULLER Sylviane<sup>2</sup>, and LUGNIER Claire<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>UMR CNRS 7213, Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 67401, Illkirch Cedex, France.

<sup>2</sup> UPR CNRS 9021, Immunologie et Chimie Thérapeutique, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France.

**Running head:** Effect of NCS 613 a novel PDE4 inhibitor in lupus in MRL/lpr mice.

**Corresponding author:**

Claire Lugnier, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7213, Biophotonique et Pharmacologie, 74 route du Rhin, BP 24, 67401 Illkirch, France.

Tel: (+33) 390 244 264, Fax: (+33) 390 244 313, E-mail: [Claire.lugnier@unistra.fr](mailto:Claire.lugnier@unistra.fr)

**Key Words:** PDE4, NCS 613, glomeruli nephritis, auto-antibodies.



## **Abstract**

Lupus nephritis (LN) remains the most common severe manifestation of SLE characterized by the presence of auto-antibodies in kidney glomeruli. Cyclic nucleotide phosphodiesterase type 4 (PDE4) that tightly regulates cAMP level in cell; has been shown to be involved in the control of kidney inflammatory responses and renal function. The aim of this study was to investigate the consequences of PDE4 inhibition by new PDE4 inhibitor, NCS 613 on kidney alterations in MRL/lpr lupus prone mice of 15 week of age in comparison with control animals. NCS 613 chronic treatment on PDE4 and cAMP regulation was investigated by radioenzymatic assays, western blot and Q-PCR. Disease outcomes were also studied by systemic autoantibodies level assessment (ELISA) and immune complexes depositions in tissues and kidney damage were assessed by histology at 15 week of age. SLE disease progression is associated to lower PDE4 activity, protein and RNA expression in kidney. Moreover, these mice exhibits low kidney cAMP level which is associated to induction and relocation of nuclear and cytoskeleton PDE4 isoforms. High level of auto-antibody in lupus prone mice leads to important immune complexes deposition in target tissues. Auto-antibodies induced- kidney damage in lupus prone mice were attested by mesengium proliferation and cellular infiltration. Interestingly we reported that NCS 613 treatment overcomes disease progression in MRL/lpr mice by decreasing systemic auto-antibodies secretion and their corresponding immune complexes deposition in kidney. Furthermore NCS 613 is able to increase kidney cAMP level, PDE4A and PDE4C mRNA ; hence this compound reverses kidney PDE4 isoforms alteration in lupus prone treated mice. These beneficial effects of NCS 613 are supported by the improved survival rate and wellbeing of treated mice. NCS 613 is a new anti-inflammatory compound and is believe to be a leading drug candidate for the treatment of inflammatory diseases such as SLE.

## Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by production of lot of antibodies against nuclear compartment (spliceosome, phospholipids and DNA) (Rahman and Isenberg DA, 2008). This disease involves in progressive and chronic inflammation of multiple joints and organs. The highest lupus incidence of lupus is observed in young women (20-50 years of age), with high prevalence in black population (*Melissa R. et al., 2003*). Lupus nephritis (LN) remains the most common severe manifestation of SLE characterized by the presence of autoantibodies complexes in kidney (Alba P., et al., 2003), that are believed to play a central role in the pathogenesis of LN. Indeed the clinical future of SLE consists mainly in glomerulo-nephropathy inducing renal failure with fatal issue. Murine model of SLE, such as MRL/lpr mice (characterized by lpr mutation concerning Fas gene), develops lupus with similar symptoms like in human i.e erythema, nephritis with proteinuria (Furukawa F. et al 1996). High production of cytokine (TNF $\alpha$ ) and auto- antibodies is a morbid cause of multiple organ chronic inflammation and damage in both human and mice (Segal, R., et al., 2001). Currently SLE is managed by symptomatic treatment, such as corticoids, as well as by antibodies and peptides targeting T and B cells, anti-TNF $\alpha$  or anti-interleukin-10 antibodies (Rahman et al., 2008). Actually, no specific treatment by chemical drugs of low molecular weight for SLE with oral administration exists. However many studies reported cellular signaling alterations in SLE during disease progression; which lead to immune system deregulations (Dumortier H., et al 2000, Hasler P, et al., 1982, Mandler R., et al., 1982). For example calcium signaling dysfunction leads to phosphorylation of protein implicated in TCR/CD3 signal transduction and T lymphocytes hyper-activity (Stekman IL., et al., 1991). Downstream receptor, cyclic nucleotide phosphodiesterases which hydrolyse cAMP and cGMP play a pivotal role in cell function such as: migration, proliferation, and inflammation (Lugnier C. 2006; Zhu Y., et al.; 2006; Cheng, J., et al 2007). Cyclic nucleotides are recognized as critical mediators of many renal functions, including solute transport, regulation of vascular tone, proliferation of parenchymal cells, and inflammation (Dousa T.P, 1999, Stefan, E., et al., 2007; Tahseldar-Roumieh R., 2007).

We have previously reported that cAMP-PDE inhibitor improves sodium excretion in rats with cirrhosis and ascite and decreased proteinuria in these animals (Ahloulay, M., et al 2005) and that NCS 613 treatment of MRL/lpr lupus prone mice overcame disease progression (Monneaux et al, 2008). NCS 613 is a new potent PDE inhibitor synthesized at Strasbourg's faculty of pharmacy which exhibits antiinflammatory by TNF $\alpha$  in guinea pig

(Reimund JM et al., 2001). Interestingly, NCS 613 did not stimulate the gastric acid secretion suggesting that this compound may produce fewer gastrointestinal side effects (Boichot E et al., 2000). These observations prompt us to investigate whether or not the cellular signaling alteration in SLE may be dependent on cAMP. If so cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE4) could be likely involved. The aim of this study was to investigate the role and consequences of PDE4 inhibition *in vivo* using a potent and specific inhibitor NSC 613 on lupus progression in MRL/lpr mice.

(, Boichot E, zt al 2000)

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Materials**

cGMP, cAMP, Tris, and EGTA and EHNA were from Sigma (St. Louis, MO, USA). Rolipram and NCS 613 were generous gift from Jean Jacques Bourguignon (Strasbourg faculty of pharmacy). [8-<sup>3</sup>H] cAMP was purchased from New England Nuclear (Boston, MA, USA) and purified by thin layer chromatography on silica gel, using isopropanol: NH<sub>4</sub>OH:H<sub>2</sub>O (70:15:15) as a solvent. Rolipram and NCS 613 were dissolved in dimethyl sulfoxide (100 % DMSO) and the final concentration of DMSO did not exceed 1 % for PDE activity assessment. PDE antibodies were from FabGennix Inc. (Frisco, TX, USA): anti-PDE4A (DP4-112AP), anti-PDE4B (PD4-201P), anti- PDE4C (PD4-301P) and anti- PDE4D (PD4-401P). Anti-GAPDH (#MAB374) was from Chemicon/Millipore. Anti-histone H3 (#1326-1), anti-EFGR (#1114-1) and anti-vimentin (#2707-1) antibodies were from Epitomics (Burlingame, California, USA). Horse radish peroxidase-conjugates were from Promega. ECL kit was from GE Healthcare. Total RNA was isolated using RNeasy mini Kit (Qiagen) and their expression analysed by Q-PCR using BIO-RAD commercial kit (iScript<sup>TM</sup> cDNA Synthesis and iQ<sup>TM</sup> SYBR Green Supermix) in MyIQ<sup>TM</sup> thermocycler. Intracellular cAMP level in mice kidney was assessed using enzyme immune-assay (Assay design, France).

### **2.2. Animals**

Four weeks of age female CBA/J (H-2<sup>k</sup>) and MR/lpr (H-2<sup>k</sup>) mice were purchased from Harlan (Gannat, France). All animal experiments were performed with the approval of the local Institutional Animal Care and Use Committee (CREMEAS).

### **2.3. Administration of PDE4 inhibitors NCS 613**

The experiments were done with four different experimental groups: CBA/J mice treated with drug vehicle (PBS, 10 % ethanol) C-, treated control CBA/J C+, MRL/lpr control L-, MRL/lpr treated L+. Five-week-old female MRL/lpr lupus prone mice or healthy CBA/J mice (Gannat, France) received NCS 613 (30 µg /100µl / mouse) in 10 % ethanol PBS via the i.v. route. Control group was given saline only (100µl PBS in 10 % ethanol/ mouse). Four administrations were given at 5, 7, 9, and 13 weeks of age. Measurements of the outcomes included the proteinuria, anti-ds-DNA antibodies levels. Animal were sacrificed by cervical dislocation.

### **2.4. Preparation of kidney extracts for PDE assays and Western blot**

CBA/J control and MRL/lpr lupus-prone mice were sacrificed at 15 weeks, 2 weeks after the end of NCS 613 treatment or ethanol treatment. Kidneys were isolated, cut in two part and immediately frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Frozen tissues were ground to powder in liquid nitrogen using a mortar/pestle set-up. The resulting tissue-powders were homogenized at  $4^{\circ}\text{C}$  with a glass-glass potter for 3 x 30 s at 1,000 rpm (100-300 mg tissue/0.5 ml buffer) of solution following composition (mM): 20 Tris, pH 7.5, 5 EGTA, 150 NaCl, 20 Na- $\beta$ -glycerophosphate, 10 NaF, 1 NaVO<sub>3</sub> + 1 µM H-89 + 1 % Triton X-100, 0.1 % Tween 20. The protein inhibitor concentration used were (µM) 166 Pefabloc, 133 aprotinin, 8.3 bestatin, 2.5 E64, 3.3 leupeptin, 1.6 pepstatin-A. The homogenates were centrifuged at 14,000 g for 10 min at  $4^{\circ}\text{C}$  and the supernatants were stored as aliquots at  $-80^{\circ}\text{C}$  until used. Protein concentration was determined following Lowry *et al.* (1951), using a compatible detergent assay. These extracts were used for PDE assay and Western blot analysis.

### **2.5. Preparation of kidney subcellular fractions**

Kidneys from 15 week-old CBA/J control and MRL/lpr lupus-prone mice were ground to powder in liquid nitrogen using a mortar/pestle set-up. The crude homogenates as well as the cytoplasmic, nuclear, membrane and cytoskeletal proteins were obtained using the Compartmental Protein Extraction Kit from Millipore (Chemicon # 2145), following the kit protocol. The quality of subcellular fractions was assessed by Western blot using specific antibodies against compartmental proteins: GAPDH for cytoplasm, EGFR for membrane, histone H3 for nucleus and vimentin for cytoskeleton.

## **2.6. PDEs activities assessment in mice tissues**

PDE activity was measured by a radioenzymatic assay as previously detailed (Keravis *et al.*, 2005) at a substrate concentration of 1  $\mu$ M cAMP in presence of 10,000 cpm [ $^3$ H]-cAMP as tracer and hydrolysis between 10- 20 %. Total cAMP-PDE activities were assessed in each sample in the presence of 1 mM EDTA and 1  $\mu$ M cAMP. Contribution of different isozymes to total cAMP-PDE activity were tested in the presence of 1  $\mu$ M cilostamide for PDE3, 10  $\mu$ M rolipram for PDE4 in each sample. All samples were tested in presence of 1 mM of EGTA and 1  $\mu$ M of substrate for total cAMP-PDE activities. Protein concentration assessed allowed us to calculate specific activity in pmol/min/mg of protein. The remained activity in presence of a specific inhibitor was subtracted of total activity for each PDE family contribution.

## **2.7. cAMP level in mice kidney**

Tissue sample frozen in liquid nitrogen were ground to a fine powder under liquid nitrogen in mortar. After liquid evaporation, the tissue was weighted and homogenized in 10 volumes of 0.1 M HCl. Homogenate was centrifuge at 1000 x g at room temperature. cAMP tissue level was measured by Assay Design<sup>TM</sup> Direct Cyclic AMP EIA Kit (Arbor USA).

## **2.8. Western blot analysis**

Protein from kidney extracts (30  $\mu$ g) as well as protein from kidney subcellular fractions (cytoplasm, nuclei, membrane and cytoskeleton) was subjected to Western blot analysis as previously described (Campos-Toimil *et al.*, 2008). Briefly, protein samples were denatured and solubilized for 5 min at 95°C in Laemmli buffer, electrophoresed on SDS 8 %-polyacrylamide gel and electrotransferred onto polyvinylidene fluoride membranes. Immunodetections were carried out using: anti- PDE4A (1/2,500), anti-PDE4B (1/2,500), anti- PDE4C (1/2,500) and anti- PDE4D (1/2,500), anti-vimentin (1/1,000), anti-EGFR (1/1,000) and anti-GAPDH (1/60,000). Immobilized antigens were detected by chemiluminescence using horse-radish peroxidase-conjugates as secondary antibodies (1/60,000), an ECL kit and autoradiography films. Autoradiography signals were captured on a GeneGenius Bio Imaging System (Syngene) using the GeneSnap software and analysed using the GeneTools software.

## 2.9. Quantitative real time RT-PCR

Frozen tissues were ground in liquid nitrogen using a mortar/pestle. The resulting tissue-powder was homogenised with a glass-glass potter 3 x 30 s at 1500 rpm in Qiazol lysis buffer. Total RNA was isolated from kidney using the RNeasy<sup>®</sup> kit (Qiagen) following manufacturer's instructions including a RNase-free DNase treatment to prevent co-amplification of genomic DNA. The concentration of the purified RNA was determined spectrophotometrically at 260 nm. The integrity of purified RNA was assessed on 4 % agar gel electrophoresis. The reverse transcription was performed with 1 µg of total RNA using iScript<sup>®</sup> cDNA synthesis kit from Bio-Rad. The  $\beta$ -actin as house-keeping gene was used for normalization. The sequences of PDE and  $\beta$ -actin oligonucleotides used as primers for real-time PCR are presented in Table 1 and were brought from Invitrogen. Specific primers of interest conserved sequence were designed with Primer3 Input (version 0.4.0). The transcript levels of PDE and  $\beta$ -actin were quantified by real-time PCR performed in the MyiQ<sup>®</sup> single-color detector system (Bio-Rad Laboratories, Inc.) using the iQ SYBR<sup>®</sup> Green Supermix (Product no. 170-8884) containing the hot-start iTaq DNA polymerase. The amplification conditions were: 95°C for 5 min, 40 cycles at 94°C for 10 seconds, 60°C for 10 seconds and 72°C for 15 seconds. Specificity of amplified products was assessed by melting curve analysis and their size was assessed on 4 % agar gel electrophoresis. All samples were processed in according to the manufacturer's guidelines.

## 2.10. Auto-antibodies analysis

Auto-antibodies directed to double stranded-DNA were tested by ELISA as previously described by *Dumoriter H et al. 2000*. Briefly Microtiter plates (cat. no. 3912; Falcon, Oxnard, CA) were coated overnight at 37°C with DNA diluted in 0.25 M citrate buffer, pH 5.4. In each assay, mouse sera diluted at 1/500 were also tested in an uncoated well incubated with coating buffer as a control. Saturation of plates was obtained by adding PBS containing 0.05 % Tween 20 (PBS-T) and 0.5 % BSA. The subsequent steps of the test were performed using mouse sera diluted 1/500 and goat anti-mouse IgG conjugated to HRP diluted 1/20,000 in PBS-T. All samples were systematically tested in at least two independent assays. The cut-off points of the assays as determined from a series of sera from 5 control CBA/J mice were 0.036 OD unit. When these threshold values were used, none of the sera from normal CBA/J mice was found positive.



Lupus prone mice develop many auto- antibodies and the low chain of these can be detected by a mouse anti-IgG. Tissue samples (20 µg of protein) were denatured and solubilised by heating for 5 min at 95°C in lysis buffer, electrophoresed on SDS 8 % polyacrylamide gel and electrotransferred on to polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. Membranes were processed for immunoblotting directly with secondary antibodies (mouse anti-IgG) using horseradish peroxidase (HRP)-conjugates (Promega; Lyon, France, 1/60,000), the ECL assay kit and autoradiography films (GE Healthcare, Saclay, France).

### **2.11. Histology**

Fresh kidneys were fixed in buffered formalin (10 %, pH 7.0) for 48 h, then embedded in paraffin and dehydrated in 70 to 100 % ethanol/xylene. 2–4 µm thick sections were made, deparaffinized, and stained with hematoxylin and eosin. Pathological changes in kidneys were determined by measuring: the size of glomeruli and microtubules with the Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) software and picture calibration.

### **2.12. Statistical analysis**

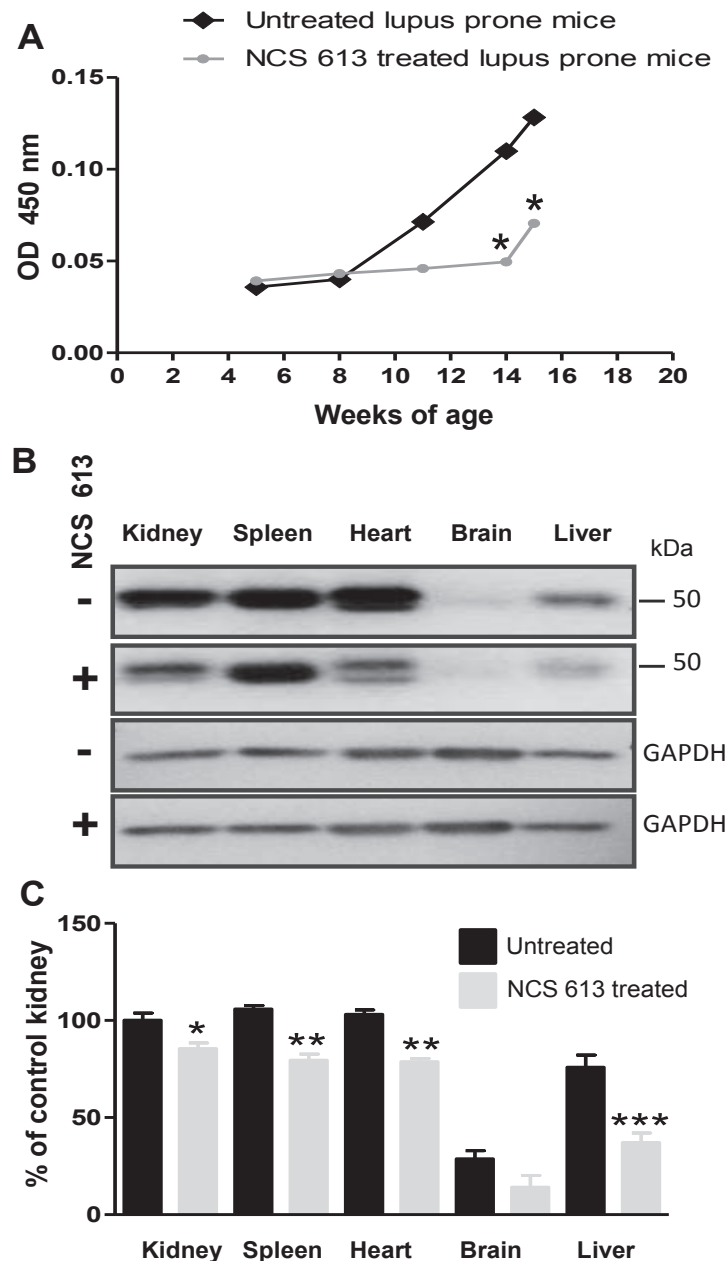
Statistical analysis of digitized PDVF membrane Western blots were performed with the one-way analysis of variance (ANOVA) and the Bonferroni's multiple comparisons post-test. Relative gene expression was calculated using the comparative threshold (Ct) method. Results were calculated as  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ,  $\Delta Ct$  being normalized with  $\beta$ -actin. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. from at least three independent experiments.

## **3. Results**

### **3.1. Effects of NCS 613 treatment on systemic auto- antibodies and their complex deposition in lupus target tissues.**

During disease progression, MRL/lpr mice produce various antibodies against nuclear compartment. These auto- antibodies directed to double stranded-DNA play a pivotal role in disease progression (Schwartz MM, 2007). The level of auto-antibodies was assessed by ELISA in MRL/lpr mice sera at 5, 8, 11, 14 and 15 weeks of age during NSC 613 treatment. Untreated mice early developed auto-antibodies and exhibit high levels of ds-DNA antibody at 14 weeks (Fig. 1A). Interestingly, auto-antibodies secretion was delayed and reduced in treated mice. The analysis of autoimmune complexes deposition in target tissue corroborates these results (Fig. 1B). This study reveals that, NCS 613 treatment decreases significantly

autoimmune complexes deposition in kidney, spleen, heart, and liver (Fig. 1C). However, no significant change was observed in brain, although this tissue remains a target for auto-antibodies. Therefore, these changes in autoantibodies productions induced by NCS 613 treatment, attest the efficiency of this treatment, allowing to investigate its effect on cAMP catabolism.



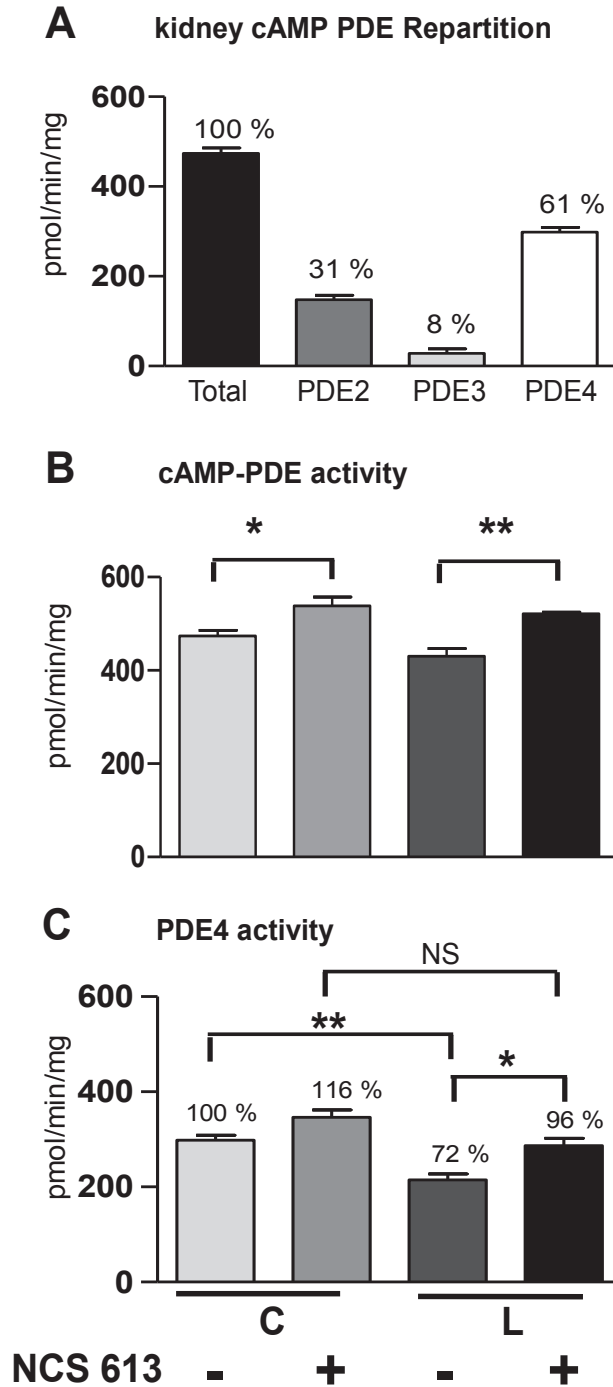
**Figure 1: Effects of NCS 613 treatments on auto-antibodies secretion and their complexes deposition in lupus mouse tissue.** Systemic auto-antibodies secretions were assessed during disease progression and NCS 613 treatment in mice. **A:** Blood were sampled at 5, 8, 11 and 15 weeks of age and analyzed by ELISA. **B:** Low chains of autoimmune antibody were detected by Western blot and their expression normalized to GAPDH. **C:** Statistical analysis of percentage of variation reported to the untreated MRL/lpr mice. Data are expressed as mean of variation percentage  $\pm$  s.e.m of n=3 mice.

### **3.2. Effects of NCS 613 treatment on cAMP-PDE activity in mice kidney**

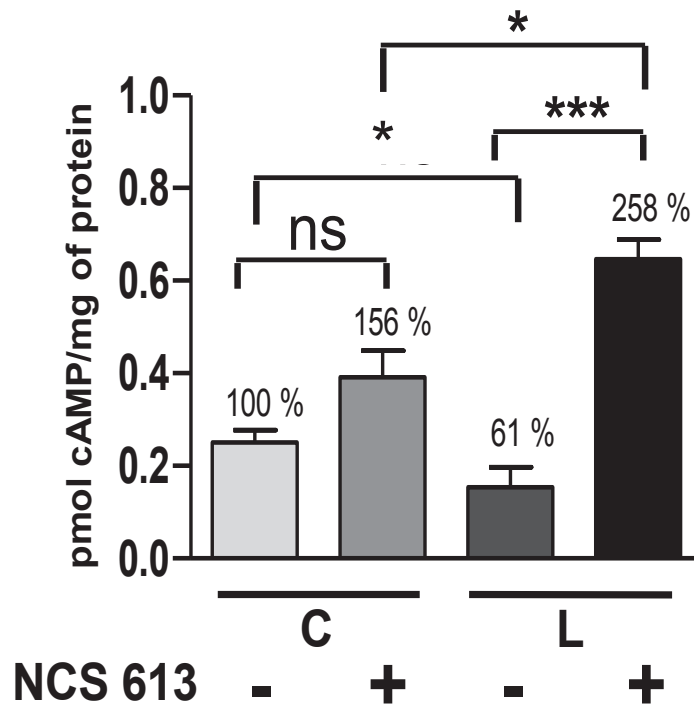
In CBA/J mice kidney, cAMP is mainly hydrolysed by PDE2, PDE3 and PDE4 (Fig 2A). In these mice kidney cAMP-PDE activity is high and PDE4 activity remains the most important cAMP hydrolysing enzymes (61 %) whereas PDE3 activity was very low (8 %), the remaining PDE2 activity being about for fold more important than PDE4 activity. After of NCS 613 chronic treatment the total cAMP-PDE activity was significantly increased in control CBA/J as well as in MRL/lpr mice kidney (Fig 2B). In CBA/J mice, there was no significant change in kidney PDE4 activity upon NCS 613 treatment (Fig 2C). But PDE4 activity was significantly decreased in control MRL/lpr mice. Interestingly, in comparison with control mice NCS 613 treatment overcame this decreased in PDE4 activity that returned closely to the control PDE4 activity (Fig. 2C).

### **3.3. Effects of NCS 613 treatment on cAMP level in mice kidney**

To ascertain the putative change in cAMP level in response to NCS 613 treatment, cAMP levels were assessed in kidney, the main target organ of lupus (Fig.3). Interestingly, in absence of treatment, cAMP level in MRL/lpr mice kidney was lower than in CBA/J mice kidney. As expected NCS 613 treatment increased 1.5 fold cAMP level in CBA/J kidney. Although this effect was not significant (n=3), it suggests a possible alteration of cAMP regulation. In MRL/lpr group, NCS 613 treatment increased about 4 folds cAMP level in (n=4). Surprisingly, this data revealed that decreased PDE4 activity is associated with a low cAMP level in untreated MRL/lpr mice kidney, and showed that NCS 613 treatment is effective in increasing cAMP level in MRL/lpr kidney.



**Figure 2: Hydrolytic activities of cAMP-PDE isozymes and their contributions in mouse kidney.** A: Total cAMP-PDE activity and relative contribution of PDE2, PDE3 and PDE4 were assessed by radio-enzymatic measurement in mice kidney. B: Assessment of kidney cAMP-PDE activities during NCS 613 treatment. C: variation of kidney PDE4 hydrolytic activity during NCS 613 treatment in MRL/lpr and control CBA/J mice. Data are expressed as pmol/min/mg of protein and represent the mean  $\pm$  s.e.m. of 4 independent experiments.

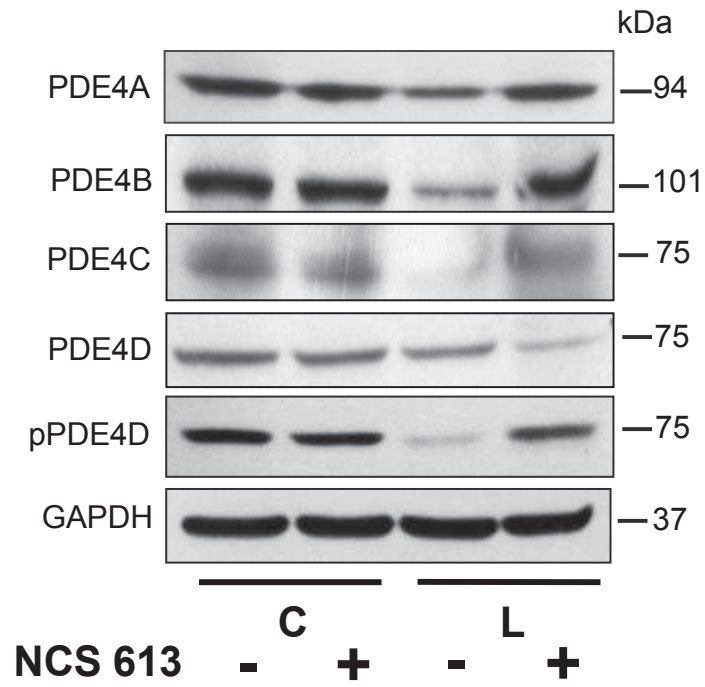


**Figure 3: Effects of NCS 613 treatment on cAMP in mouse kidney.** Total cAMP was extract from frozen tissue and intracellular cAMP was assessed by competitive enzyme immune-assay. Concentration of cAMP was reported to protein concentration in the sample. **A:** Variation of kidney cAMP level upon NCS 613 treatment. Relative detection of kidney PDE4 isoforms was performed using specific antibodies against PDE4A, PDE4B, PDE4C, PDE4D and GAPDH. **B:** Western blot analysis. Data are expressed as mean  $\pm$  s.e.m of picomol of cAMP/mg of protein.

### **3.4. Effects of NCS 613 treatment on PDE4 protein and mRNA expressions in mice kidney.**

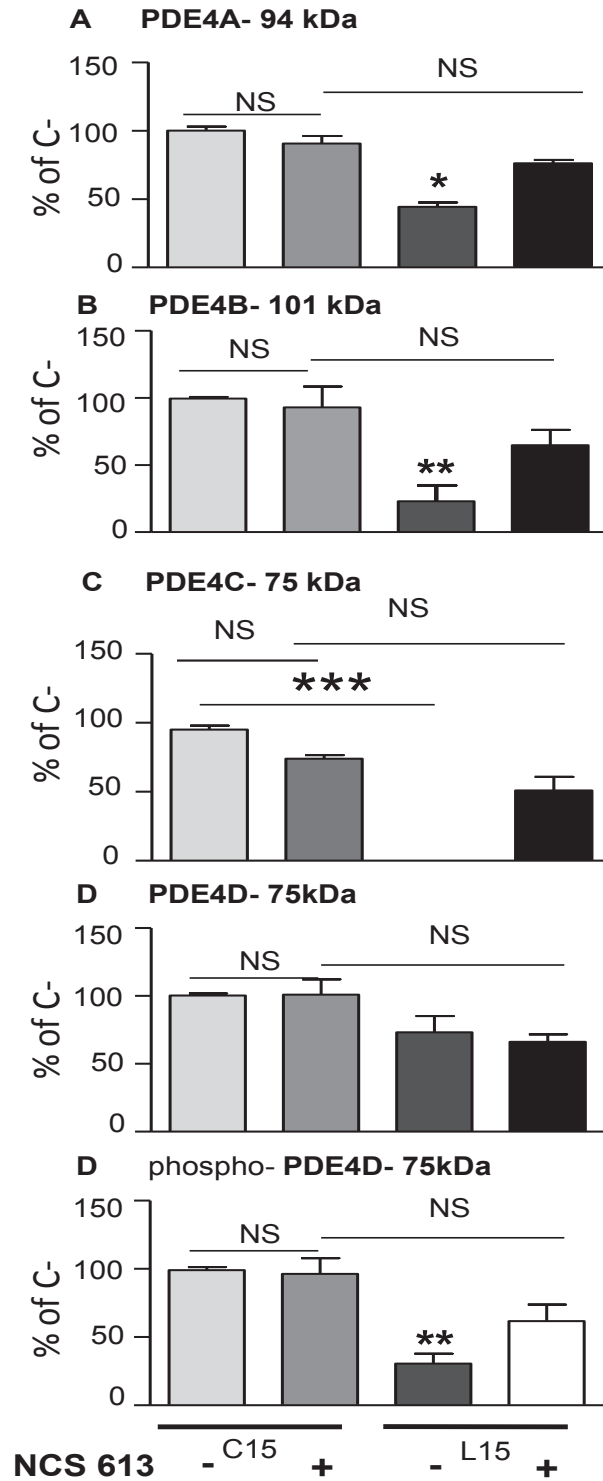
The expression of kidney PDE4 protein isoforms was analyzed by Western blot (Fig 4). Any significant change in kidney PDEs isoform expression were observed in CBA/J mice upon NCS 613 treatment in agreement to the fact that PDE4 activity and cAMP level was not modified. Conversely, significant decreases of PDE4 isoform proteins were reported in untreated MRL/lpr mice. Interestingly, NCS 613 treatment increased PDE4 isozymes proteins in MRL/lpr to extent the level of control mice (Fig. 4). PDE4A- 94 kDa, PDE4B- 101 kDa, PDE4C- 75 kDa and PDE4D- 75kDa were significantly decreased in untreated MRL/lpr. Interestingly NCS 613 reverse these alterations of PDE4 proteins expressions as it is showed in western blot analysis (Fig. 4A).

Two weeks after the end of NCS 613 treatment, there is a significant increased of PDE4A and PDE4C mRNA levels in CBA/J treated mice. In MRL/lpr mice, NCS 613 treatment significantly increased only PDE4C mRNA level about 3 fold (Fig. 6). The PDE4B and PDE4D mRNA remain unchanged during this treatment.



**Figure 4: Effects of NCS 613 treatment on pattern of PDE4 protein expression in mouse kidney.** PDE4A, PDE4B, PDE4C, and PDE4D protein expression were assessed on 15 week-old CBA/J control mice (C) as well as MRL/lpr (L) mice NCS 613 treated (+) or not (-). The sizes of signals are shown in kDa.





**Figure 3**

**Figure 5: Effects of NCS 613 treatment on PDE4 protein expression in mice kidney.**

Autoradiography signals were captured on a GeneGenius Bio Imaging System (Syngene) using the GeneSnap software and analysed using the GeneTools software. Statistical analysis of interested subtype PDE4 isoforms: (A) 94 kDa PDE4A, (B) 101 kDa PDE4B, (C) 75 kDa PDE4C, (D) 75 kDa PDE4D and (E) 75 kDa p-PDE4D. The pattern of protein expression was normalized to GAPDH content, and percentage of variation was reported to the untreated control. Data are expressed as mean of variation in %  $\pm$  s.e.m (n=5).

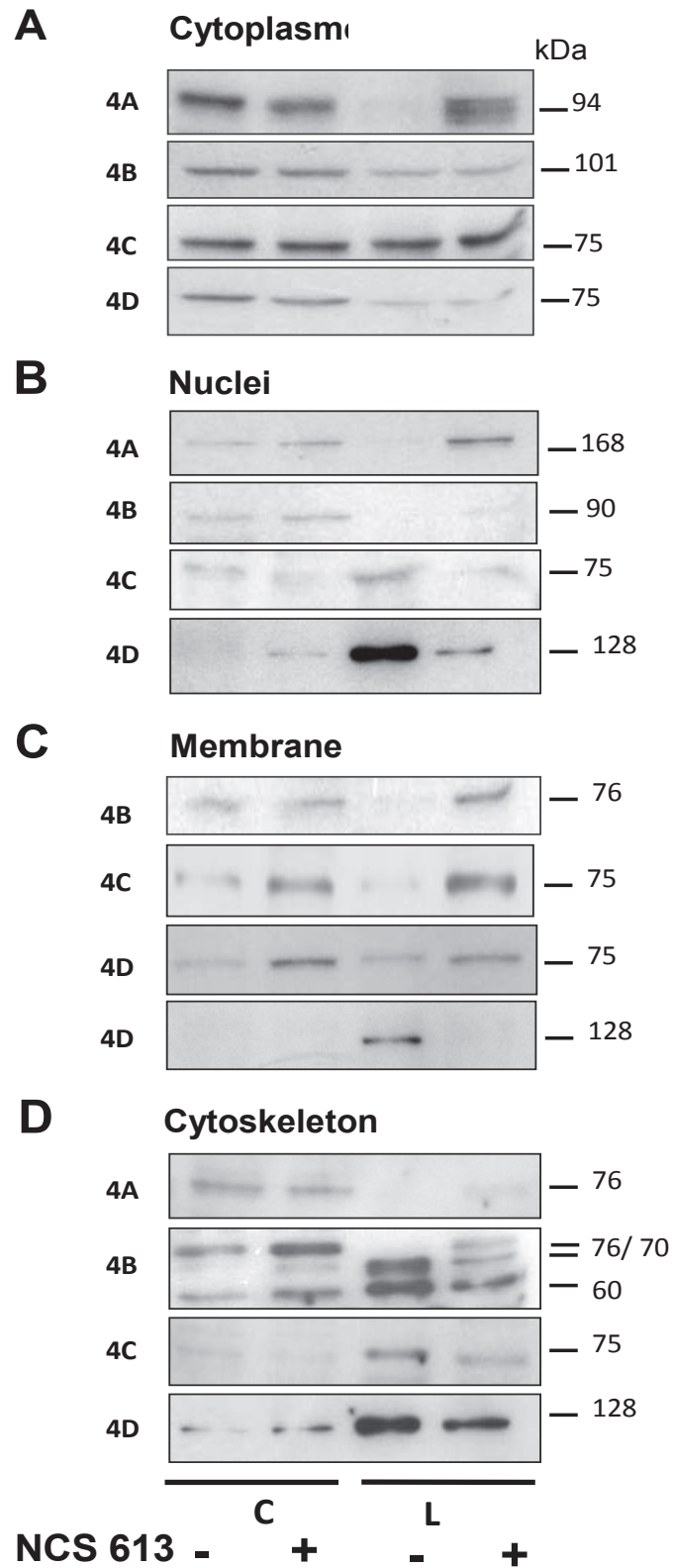


### **3.5. Effects of NCS 613 treatment on PDE4 isoforms subcellular distribution.**

To further investigate PDE4 protein distribution during disease progression and effect of NCS 613 treatment, we analyzed their compartmentalizations by Western blot (Fig.7). Four subcellular fractions were analyzed: cytoplasm, nuclei, membrane and cytoskeleton. NCS 613 treatment did not modify the expression of the four cytoplasmic PDE4s proteins in CBA/J mice kidney. In cytoplasmic fraction, PDE4A-94 kDa was significantly down-regulated in untreated lupus prone mice. However NCS 613 treatment re-established PDE4A-94 kDa expression to the level of control mice. PDE4B-101 kDa and PDE4D-75 kDa decreased with disease in MRL/lpr whereas, PDE4C-75 kDa remained unchanged. Nuclear PDEA-168 kDa was decreased in lupus prone mice when compared to control and NCS 613 treatment re-established the expression of this long isoform in MRL/lpr treated mice.

Surprisingly, there was an increase in PDE4C-75kDa and PDE4D-128 kDa in non-treated MRL/lpr mice kidney nuclei and NCS 613 treatment reversed these alterations. Membrane PDE4C- and 4D-75kDa were increased by NCS 613 treatment in both CBA/J and MRL/lpr mice kidney. NCS 613 also re-established PDE4B-76 kDa level which was undetectable in the untreated group. In the same way, the PDE4D-128 kDa was increased in untreated MRL/lpr mice and decreased by the treatment.

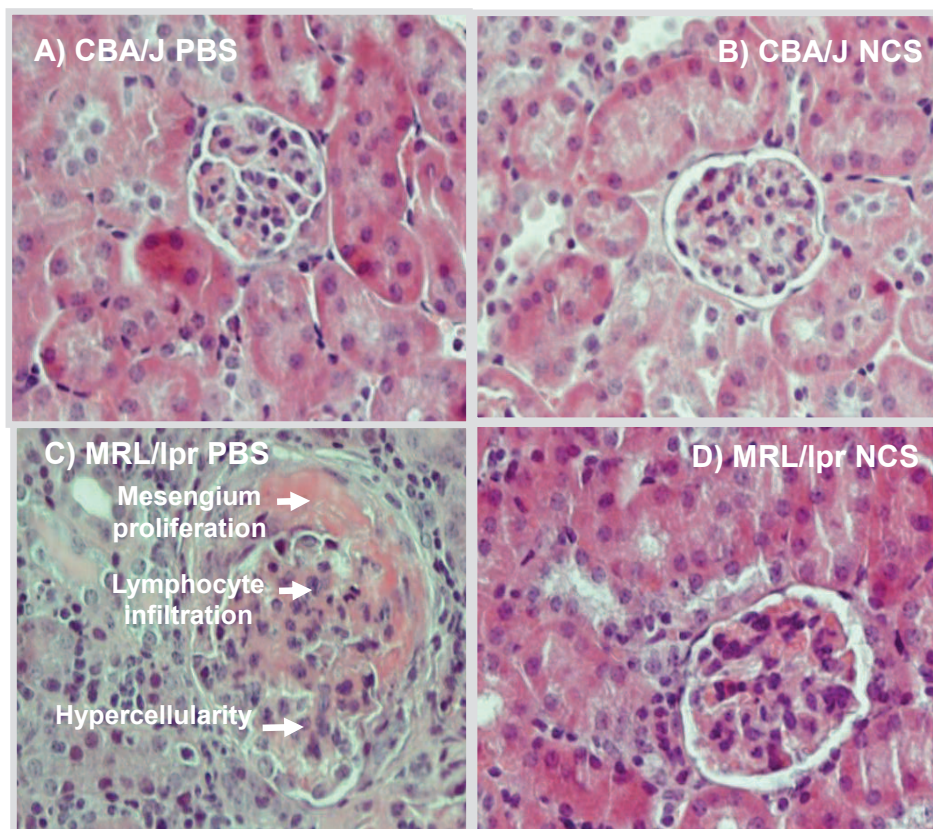
In cytoskeleton, no change in PDE4 protein distribution were found in CBA/J mice excepted for PDE4B isozyme that was increased in this compartment. Many alterations of PDE4 protein expressions occurred in MRL/lpr mice. They were sometimes reversed by the NCS 613 treatment. This was the case of up-regulated PDE4B- 70 and - 60 kDa, PDE4C- 75 kDa and long the isoform of PDE4D-128 kDa that is induced in MRL/lpr mice. Cytoskeleton PDE4B- 76 kDa, undetectable in untreated MRL/lpr, is increased with NCS 613 treatment in CBA/J and also re-established in treated MRL/lpr mice. But PDE4A- 76 kDa decreased with the disease progression and NCS 613 failed to reverse this alteration.



**Figure 8: Effects of NCS 613 treatment on PDE4 isoforms subcellular distribution.** Compartmental proteins were obtained by fractionation using Millipore kit and 10- 20  $\mu$ g of each fraction were subject to western blot analysis (n=3 mice).

### 3.6. Effects of NCS 613 treatment on glomeruli from CBA/J and MRL/lpr mice.

The kidney section stained with eosin-hematoxylin revealed no glomeruli histopathological change in control CBA/J mice kidney. However, in MRL/lpr lupus-prone mice glomeruli size were increased and lymphocytes infiltration was consistently observed (Fig. 2). Also, MRL/lpr lupus-prone mouse kidney exhibited increased proliferation of mesangial cells with a lot of lymphocytes present in the glomeruli due to auto-antibodies deposition.



**Figure 2: Effects of NCS 613 treatment on 15 week-old mouse glomerulonephritis.** Glomeruli from control mice CBA/J untreated (A) and NCS 6136 treated (B) and also lupus prone mice untreated (C) and NCS 613 treated mice (D) were analyzed after Eosin–Hematoxylin staining, as described in Material and Methods. Pictures were captured with a 40 x- magnification. Pathological change in kidney concerns: mesengium proliferation, lymphocyte infiltration and hypercellularity around the glomeruli.

## 4. Discussion

Lupus nephritis has been described as the most serious complication of systemic lupus erythematosus (SLE) and strongest predictor of poor outcome (Alba P., et al., 2003). Increasing evidences recognized cyclic nucleotides as critical mediators of many renal functions, including solute transport, regulation of vascular tone, proliferation of parenchymal cells and inflammation (Dousa, T. P. 1999; Cheng J., et al.; 2004; Stefan, E., et al. 2007). These findings prompted us to focus on kidney inflammation and injury leading to fatal renal failure and the protective effect of NCS 613 chronic treatments showed previously (Monneaux F., et al 2008). In this study, we report that NCS 613 increases total cAMP-PDE and PDE4 hydrolytic activities in treated control as well as MRL/lpr mice in association with cAMP elevation. These observations were supported by PDE4 increases in protein and mRNA. NCS 613 also decreases auto-antibodies secretions and their corresponding immune complexes depositions in lupus prone mice target tissues; which is revealed at kidney tissue level.

### 4.1 NCS 613 reduces auto-antibodies secretions and their corresponding immune complexes deposition in target tissue.

We were interested in auto-antibodies secretion, since lupus is an hallmark of the-autoimmune disease and also their deposition in target tissue lead to complement activation and inflammation (Schwartz MM. 2007 Hanrotel-Saliou, et al.; 2010). Many auto- antibodies are produced by auto- reactive B cell during disease progression targeting nuclear component such as spliceosome, phospholipids and DNA. We reported in this study that early, lupus prone mice without treatment spontaneously developed double-strained auto-antibodies; which level rapidly increased with disease progression compared to treated mice. Detection of Abs in the main target tissues of lupus mice allowed us to demonstrate the beneficial effect of NCS 613 on of autoimmune progression management. Many therapies target B and T cell to down-regulate immune function and Abs secretion ( *Rahman A. et al 2008*). Consistently these results support that the novel PDE4 inhibitor NCS 613 can modulate immune response by suppressing hyper-activation of T cell and auto-reactive B cell, and consequently reduced tissue inflammation mediated by complexes auto-antibodies deposition. The site of deposition of immune complexes in different regions of the glomerulus concerns: mesangium, subendothelial, or subepithelial space. Immunosuppressive effect of PDE4 inhibitor was previously reported by *Kevin D., et al 1985*. These authors reported that phosphodiesterase

inhibition by Ro 20-1724 reduces hyper-IgE synthesis by atopic dermatitis cells *in vivo*. We observed that in all tissue investigated NCS 613 significantly decreased auto-antibodies complexes deposition, excepted in the brain. Auto-antibody physiopathology has been well investigated and its clinical outcomes are ethnicity related (Ramos P. S., et al.; 2010; Siso, A., et al., 2010). Alba et al 2003 have reported that higher proportion of anti-dsDNA, anti-RNP, anti-Sm, and lupus anticoagulant (LA) indicate significant in nephritis in SLE patients of black ethnic origin.

#### **4.2 NCS 613 reduced kidney damage in MRL/lpr mice**

Pathological change of glomeruli was investigated in this study because it is believed that every tissue component of the kidney can be affected, glomeruli being the most altered structure in patients and animal (Cavallo T, et al.; 1980 Giannakakis K, 2010). Kidney section was stained with hematoxyline-eosine and we focus our study on glomeruli structure changes and cellular infiltration. CBA/J mice showed normal glomeruli with regular distribution of mesengial cell within. NCS 613 treatment has no effect on CBA/J mice kidney. Expectedly we found many change and hyper-remodeling in untreated lupus prone mice glomeruli. These concerned: mesengium proliferation, lymphocyte infiltration and hypercellularity around the glomeruli. Proliferation, or rather glomerular hypercellularity, is one of the most typical consequences of immune complex deposition in lupus nephritis (Schwartz, M. Et al., 2009). The size of glomeruli increased in MRL/lpr mice subsequently to mesengium proliferation, which affects renal function mainly glomerular filtration (Wang X., et al 2010). This state of kidney inflammation is corroborated by lymphocytes infiltration to inflammatory site and hypercellularity that may be due to mesengial cell proliferation as a result of autoantibody deposition. Among more than 100 auto-Abs are described in the literature and reported in SLE, only a few displays a direct glomerular binding capacity (Hanrotel-Saliou, C., 2010). Interestingly we found that NCS 613 treatment decreased kidney damage in MRL/lpr mice since their glomeruli showed decreased size and decreased mesengium proliferation compared to untreated mice. On one hand survival and wellbeing are justified by systemic decreased secretion of autoantibody due to anti-inflammatory and immuno-suppressessive effect of NCS 613. On another hand by increased cAMP level in kidney, since it have been previously reported that in mesangial cells, an intracellular pool of cAMP directed by PDE4 inhibits reactive oxygen species and expression of the potent proinflammatory cytokine monocyte chemoattractant protein 1 (Cheng, J., et al 2005).



### 4.3 PDE4 and cAMP regulation upon NCS 613 chronic treatment

Since PDE4 is the major contributor in CBA/J kidney and that cAMP dysregulation was reported in lupus we focused our work on PDE4 alterations in kidney tissue (Mandler R et al., 1982). Interestingly, NCS 613 treatment increased more significantly total cAMP-PDE in MRL/lpr mice kidney in comparison with control animal, restoring the initial control cAMP-PDE activity observed in naive mice. This indicates that, PDE4 which contributes for 61 % of total activity and is specifically inhibited by NCS 613 might be implicated in SLE alterations. Untreated lupus prone mice display significantly lower PDE4 activity compared to untreated control CBA/J mice.

Interestingly, these mice exhibit a significant reduced cAMP level in kidney. These apparent opposed results support the fact PDE4 activity is normally down-regulated by effectors when cAMP level decreased in cell. PDE4 isoenzymes are regulated mostly by PKA, ERK and others effectors (Houslay, M. D., 2010). On the other hand the significant decreased in PDE4 activity possible might be attributed as a result of ERK dependant phosphorylation of PDE4 long form. When cAMP is increased in cell, PKA catalytic subunit can phosphorylate PDE4 long isoform to increase the  $V_{max}$  and their capacity to rapidly breakdown intracellular cAMP. Sustained PDE4 inhibition by increasing cAMP level can activates PKA which by phosphorylation activates cAMP responsive element binding CREB allowing synthesis of PDE4. This is supported by the idea that long term or chronic PDE4 inhibition increases local cAMP level and triggers feedback mechanism to hydrolyze and decrease the substrat to normal level. We previously showed that sustained inhibition of PDE4 by rolipram (8h) in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) induced an increase in PDE4 activity, possibly as a compensatory mechanism to accelerate cAMP degradation (Campos-Toimil M., et al., 2008).

To better understand PDE4 activity increase in response to NCS 613 treatment we assessed cAMP level in mice kidney. Although results were not significant cAMP appeared to increase in treated control mice compared with control mice. Conversely, NCS 613 significantly increased cAMP level about 4 fold in lupus prone mice compared with untreated MRL/lpr mice. These results highlight our data on the regulation of PDE4 activity in response to cAMP elevation or breakdown. On one hand, the decreased PDE4 activity obtained in untreated MRL/lpr mice kidney is associated with a lower level of cAMP in this tissue when compared to control mice. On the other hand, the increased in PDE4 activity subsequent to NCS 613 treatment in lupus prone mice might induce a better effect on PDE4 inhibition is of

great interest, since cAMP increasing agent are behave as anti-inflammatory compound (Houslay M. D., 2010). Therefore it could be suggest that beneficial effects of NCS 613 are related to its PDE4 inhibitory effect that *in vivo* protects tissue inflammation and damage. Other beneficial effect that might be associated to cAMP elevation would be to improve renal functions including solute transport, regulation of vascular tone and glomerular filtration. PDE4 inhibitors have been demonstrated to exhibit beneficial effect on renal physiology since these compounds improves renal injury induce by LPS (Jonassen, T. E., et al 2002;) or renal dysfunction in cirrhotic rats, such as sodium excretion and proteinuria (Ahloulay M., et al 2005).

Western blot analysis revealed that PDE4 protein remained unchanged after 6 week of NCS 613n treatment in CBA/J healthy mice. This report confirms the fact NCS 613 did not affect non pathological PDE4 pattern expression and suggest low sides effects of this compound in normal mice. Conversely we reported, in comparison with treated mice, down regulation of most PDE4 isoforms proteins in untreated MRL/lpr mice, which exhibit low PDE4 activity associated with decreased cAMP level in kidney. Interestingly our data support the fact that NCS 613 treatment in MRL/lpr mice increase cAMP level in mice kidney. However, the paralleles variations of cAMP level and PDE4 activity raised the question about cAMP and PDE4 relationship. Indeed, PDE4A 94 kDa and PDE4B 101 kDa are significantly decreased in untreated MRL/lpr; the NCS 613 treatment reverses this modification. Importantly PDE4C 75 kDa which is turned off in lupus prone mice was induced with NCS 613 treatment. PDE4D 75 kDa remained unchanged in MRL/lpr even if it seems to be down-regulated. As expected our results showed a significant decrease of phosphorylated PDE4D 75 kDa isoform in untreated MRL/lpr which increased with NCS 613 treatment as expected. PKA dependent phosphorylation of PDE4 is known to increase catalytic activity; interestingly we observed an increase in PDE4D phosphorylation associate to high cAMP level. This later observation confirms our suspicion that MRL/lpr mice kidneys exhibit high inflammation correlated with low cAMP level. Chronic inflammation occurs in many autoimmune diseases and represents a deleterious process leading to multiple organ damage. Our results suggest that PDE4 isoforms inhibition by NCS 613 might overcome this inflammation by increasing cAMP level.

The PDE4 mRNA variations in the kidney analyzed by Q-PCR revealed that NCS 613 did not affected PDE4D and PDEB expressions in control or MRL/lpr mice. However, NCS 613 increased PDE4A mRNA in treated mice. Interestingly we found that PDE4C mRNA is decreased in agreement with the extinguished PDE4C-75 kDa protein. The increased kidney

PDE4C mRNA subsequent to NCS 613 treatment in MRL/lpr support our idea that PDE4 enzymatic regulation in response to chronic inhibition might also involve *de novo* synthesis of PDE4 protein, this is attested by increased level of transcript (PDE4A and PDE4C mRNA) and PDE4 proteins.

#### **4.4 PDE4s isoforms relocation following NCS 613 treatment**

Another important question that we need to discuss in this paper is cAMP compartmentalization and PDE4 distribution during disease progression. Of course intracellular cAMP is compartmentalized by spatio-temporal distribution of PDE4, its effectors PKA and ERK (Keravis T. and Lugnier C., 2010; Houslay, M. D., 2010, Stefan, E., et al.; 2007; Lugnier C. 2006) and small anchoring proteins such as AKAP.

We did not report any change in cytoplasmic, and nuclear PDE4s expression in CBA/J mice NCS 613 treated or not. In cytoskeleton and membrane, PDE4C isoforms as well as PDE4B, appeared to be increased with treatment in control mice. However, in untreated MRL/lpr that suffered of kidney inflammation associated to low cAMP, we reported many alterations of PDE4 expression. These alterations are predominant in nuclear and cytoskeleton compartments. Although PDE4s expressions are decreased in many compartments of lupus prone mice kidney compared to control mice, we found new variants of PDE4 protein in nucleus and cytoskeleton. There is induction of a long form, in nuclear and cytoskeleton PDE4D 128 kDa in untreated MRL/lpr when compared to control mice. In the cytoskeleton compartment the new variants PDE4B-60 kDa and 70 kDa, as well as PDE4C 75 kDa, are induced in lupus prone mice. These results suggest that during disease progression characterized by inflammation in kidney, cytoplasmic and membrane PDE4 proteins are downregulated subsequent to then relocalized in cytoskeleton and nucleus in order to hydrolyze cAMP favoring CREB phosphorylation and probably other inflammatory nuclear transcription factor. The decreased cAMP level in lupus prone mice might be associated with PDE4 relocalization in cytoskeleton and nuclear. Conversely NCS 613 treatment reverses PDE4 isoforms alterations in MRL/lpr mice kidney: i) by increasing the isoforms which are down regulated in lupus mice kidney (cytoplasmic PDE4A 94 kDa, nuclear PDE4 168 kDa, membrane PDE4B, 4C 75 kDa) in agreement with the reported induction of PDE4 after prolonged accumulation of cAMP (Campos-Toimil E., et al., 2008); ii) by decreasing the aberrant induction and upregulated isoforms such as nuclear, membrane and cytoskeleton PDE4D 128 kDa, cytoskeleton PDE4B and PDE4C. PDE4 alterations and relocalizations

were found some diseases (Giorgi M. et al., 2004, Moon E. et al., 2002). In that way, it was reported that the induction of mAKAP, occurring in cardiac myocytes upon hypertrophy, causes PDE4D3 to relocalize around the nucleus with mAKAP (Houslay M.D. et al., 2010).

## **Conclusion**

Our study revealed the pivotal role of PDE4 isoenzyme in chronic inflammation taking SLE as a model. Alterations of hydrolytic activities, expressions and location of kidney PDE4 isoforms subsequent to cAMP low rate is a hall mark of the inflammation process. The potent PDE4 inhibitor NCS 613, overcomes lupus disease progression by reducing systemic autoantibody secretion reduced damage in lupus prone mice. Moreover, NCS 613 increases kidney cAMP level which is correlated to a lower inflammation status and improved renal function. This potent PDE4 inhibitor also reverses kidney PDE4s isoforms alterations in NCS 613 treated mice which return to control levels. NCS 613 is a potent anti-inflammatory compound which could be developed for the treatment of chronic inflammatory diseases more particularly in SLE.

## **Acknowledgments**

We are grateful to Dr Marco Conti from Stanford University, USA, for the gift of with AC55 and K118 antibodies; Dr Eric Rousseau from department of physiology and biophysics FMSS, Université de Sherbrooke, for stimulating discussions and reviewing of this paper and Ms H el ene Justiniano for her technical assistance.

## **References**

Ahloulay, M., Bankir, L., Lugnier, C., Le Bec, A., Poirel, O., Moreau, R., et al. Cyclic AMP-phosphodiesterases inhibitor improves sodium excretion in rats with cirrhosis and ascites. *Liver International : Official Journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2005. 25(2), 403-409.

Alba P., Bento, L., Cuadrado, M. J., Karim, Y., Tungekar, M. F., Abbs, I., et al.. Anti-dsDNA, anti-sm antibodies, and the lupus anticoagulant: Significant factors associated with lupus nephritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2003. 62(6), 556-560.

Adler M, Chambers S, Edwards C, et al. An assessment of renal failure in an SLE cohort with special reference to ethnicity, over a 25-year period. *Rheumatology*. 2006. 45:1144–1147.

Boichot E, Wallace JL, Germain N, Corbel M, Lugnier C, Lagente V, Bourguignon JJ. Anti-inflammatory activities of a new series of selective phosphodiesterase 4 inhibitors derived from 9-benzyladenine. *J Pharmacol Exp Ther*. 2000 Feb;292(2):647-653.

(Reimund JM et al., 2001, Boichot E, et al 2000)

Campos-Toimil M., Keravis, T., Orallo, F., Takeda, K., & Lugnier, C. Short-term or long-term treatments with a phosphodiesterase-4 (PDE4) inhibitor result in opposing agonist-induced  $Ca^{2+}$  responses in endothelial cells. *British Journal of Pharmacology*, 2008. 154(1), 82-92.

Cavallo T, Kelley VE, Granholm NA. Glomerular permeability: ultrastructural quantitative studies relating proteinuria to pathologic features in murine lupus nephritis. *American Journal of Pathology*. 1980. 101(1):93-100.

Cheng, J., Diaz Encarnacion, M. M., Warner, G. M., Gray, C. E., Nath, K. A., & Grande, J. P. TGF-beta1 stimulates monocyte chemoattractant protein-1 expression in mesangial cells through a phosphodiesterase isoenzyme 4-dependent process. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 2005. 289(4), C959-C970.

Cheng, J., & Grande, J. P. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) inhibitors: Novel therapeutic agents for progressive renal disease. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood, N.J.), 2007. 232(1), 38-51.

Cheng, J., Thompson, M. A., Walker, H. J., Gray, C. E., Diaz Encarnacion, M. M., Warner, G. M., et al. Differential regulation of mesangial cell mitogenesis by cAMP phosphodiesterase isozymes 3 and 4. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 2004. 287(5), F940-F953.

Dousa, T. P. Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. *Kidney International* . 1999. 55(1), 29-62.

Dumortier H, Monneaux F, Jahn-Schmid B, Briand JP, Skriner K, Cohen PL, Smolen JS, Steiner G, Muller S. B and T cell responses to the spliceosomal heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2 and B1 in normal and lupus mice. *Journal of Immunology*. 2000. 15; 165(4):2297-2305.

Furukawa, F., Yoshimasu, T., & Kanazawa, N. Pathogenesis of cutaneous lupus erythematosus from LE-prone mice. *Nihon Rinsho Men'Eki Gakkai Kaishi*. Japanese Journal of Clinical Immunology, 2010. 33(4), 169-173.

Giorgi M, Modica A, Pompili A, Pacitti C, Gasbarri A The induction of cyclic nucleotide phosphodiesterase 4 gene (PDE4D) impairs memory in a water maze task. *Behav Brain Res*. 2004 Sep 23;154(1):99-106.

Gudrun E Norby, Erik H Strøm, Karsten Midtvedt, Anders Hartmann, Inge-Margrethe Gilboe, Torbjørn Leivestad, Jean Stenstrøm, Hallvard Holdaas Recurrent lupus nephritis after kidney transplantation: a surveillance biopsy study. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:1484-1487

Hasler P, Schultz LA, Kammer GM. Defective cAMP-dependent phosphorylation of intact T lymphocytes in active systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990) 87, 1978-1982.

Hanrotel-Saliou, C., Segalen, I., Le Meur, Y., Youinou, P., & Renaudineau, Y. Glomerular antibodies in lupus nephritis. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, (2010). DOI 10.1007/s12016-010-8204-4

Houslay MD. Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown. *Trends Biochem Sci.* 2010; 35(2):91-100.

Houslay, M. D., Schafer, P., & Zhang, K. Y. Keynote review: Phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discovery Today*, 2005. 10(22), 1503-1519.

Jonassen, T. E., Graebe, M., Promeneur, D., Nielsen, S., Christensen, S., & Olsen, N. V. Lipopolysaccharide-induced acute renal failure in conscious rats: Effects of specific phosphodiesterase type 3 and 4 inhibition. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2002. 303(1), 364-374.

Keravis, T., & Lugnier, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE) and peptide motifs. *Current Pharmaceutical Design*, 2010. 16(9), 1114-1125.

Keravis, T., Thaseldar-Roumie, R., & Lugnier, C. Assessment of phosphodiesterase isozyme contribution in cell and tissue extracts. *Methods in Molecular Biology*, 2005. 307, 63-74.

Kevin D. C., Kefi K., Sai C. C., Jon M.H. Phosphodiesterase inhibition by Ro 20-1724 reduces hyper-IgE synthesis by atopic dermatitis cells in vivo. *Journal of investigative dermatology*. 1985. 84: 477-282.

Giannakakis K, Faraggiana T. Histopathology of Lupus Nephritis. *Clinical Review in Allergy and Immunology*. 2010. DOI: 10.1007/s12016-010-8207-1

Lugnier, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 2006. 109(3), 366-398.

Mandler R, Birch RE, Polmar SH, Kammer GM, Rudolph SA. Abnormal adenosine-induced immunosuppression and cAMP metabolism in T lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1982) 79, 7542-546.

Moon E, Lee R, Near R, Weintraub L, Wolda S, Lerner A. Inhibition of PDE3B augments PDE4 inhibitor-induced apoptosis in a subset of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2002 Feb;8(2):589- 595.

Melissa R. Arbuckle, Micah T. McClain, Mark V. Rubertone, R. Hal Scofield, Gregory J. Dennis, Judith A. James, and John B. Harley. Development of Autoantibodies before the Clinical Onset of Systemic Lupus Erythematosus. *New England Journal of Medicine* 2003; 349:1526-1533.

Mok C. C. and Tang S. S. K., Incidence and predictors of renal disease in Chinese patients with systemic lupus erythematosus. *American Journal of Medicine*, 2004.117,(10), 791–795



Opara R, Robbins DL, Ziboh VA. Cyclic-AMP agonists inhibit antiphospholipid/beta2-glycoprotein I induced synthesis of human platelet thromboxane A2 in vitro. *J Rheumatol*. 2003 Jan;30(1):55- 59.

Rahman A, Isenberg DA. Systemic lupus erythematosus. *New England Journal of Medecine*. 2008. 28; 358(9): 929-939.

Ramos, P. S., Brown, E. E., Kimberly, R. P., & Langefeld, C. D. Genetic factors predisposing to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Seminars in Nephrology*, 2010. 30(2), 164-176.

Reimund JM, Raboisson P, Pinna G, Lugnier C, Bourguignon JJ, Muller CD. Anti-TNF-alpha properties of new 9-benzyladenine derivatives with selective phosphodiesterase-4- inhibiting properties. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001 ;288(2):427-434.

Schwartz, M. M., Korbet, S. M., Katz, R. S., & Lewis, E. J. Evidence of concurrent immunopathological mechanisms determining the pathology of severe lupus nephritis. *Lupus*, 2009. 18(2), 149-158.

Schwartz MM. Pathology of lupus nephritis. *Seminar in Nephrology*. 2007, 27:22–34

Schwartz MM., Korbet SM, Lewis EJ The prognosis and pathogenesis of severe lupus glomerulonephritis. *Nephrology in Dialysis Transplantation*. 2008; 23(4):1298-1306.

Segal, R., Dayan, M., Zinger, H., & Mozes, E. Suppression of experimental systemic lupus erythematosus (SLE) in mice via TNF inhibition by an anti-TNF alpha monoclonal antibody and by pentoxiphylline. *Lupus*, 2001. 10 (1), 23-31.

Stekman IL, Blasini AM, Leon-Ponte M, Baroja ML, Abadi I, Rodriguez MA. Enhanced CD3-mediated T lymphocyte proliferation in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*. 1991 Apr;34(4):459-467.

Stefan, E., Wiesner, B., Baillie, G. S., Mollajew, R., Henn, V., Lorenz, D., et al. Compartmentalization of cAMP-dependent signaling by phosphodiesterase-4D is involved in the regulation of vasopressin-mediated water reabsorption in renal principal cells. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 2007. 18(1), 199-212.

Tahseldar-Roumieh, R., Keravis, T., Maarouf, S., Justiniano, H., Sabra, R., & Lugnier, C. PDEs1-5 activity and expression in tissues of cirrhotic rats reveal a role for aortic PDE3 in NO desensitization. *International Journal of Experimental Pathology*, 2009. 90(6), 605-614.

Wang, X., Ward, C. J., Harris, P. C., & Torres, V. E. Cyclic nucleotide signaling in polycystic kidney disease. *Kidney International*, 2010. 77(2), 129-140.

Zhu Y., Yao, J., Meng, Y., Kasai, A., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., et al. Profiling of functional phosphodiesterase in mesangial cells using a CRE-SEAP-based reporting system. *British Journal of Pharmacology*, 2006. 148(6), 833-844.



### **III.3 Manuscrit: Cyclic GMP catabolism up-regulation in MRL/lpr lupus prone mice is associated to organ remodeling.**

**Mise en contexte :** le lupus érythémateux disséminé est une maladie auto-immune caractérisée par une inflammation chronique entraînant à long terme des dommages tissulaires et la perte de certains organes. Dans les modèles murins du lupus comme chez les patients il est bien établi que l'inflammation chronique conduit à une organomégalie (néphromégalie, splénomégalie) (Schwartz, et al 2007). La souris lupique MRL/lpr développe au cours de la maladie une splénomégalie, une hépatomégalie et une néphromégalie. Les phosphodiésterases des nucléotides cycliques activées par le complexe calcium/calmoduline (PDE1) sont impliqués certains pathologies humaines conduisant à un fort remodelage tissulaire ; notamment l'hypertrophie cardiaque (Miller et al 2009 ; Mokni et al., 2010) et la leucémie (Abusnina, et al., 2010).

Bien que certaines études attribuent le phénomène d'organomégalie à une infiltration leucocytaire aux niveaux des sites inflammatoires, le dépôt de complexes immuns dans les organes cibles peut aussi entraîner la prolifération de certains types cellulaires conduisant à l'hypertrophie (Shoenfeld, et al., 2007). Les isoformes de PDE1 sont impliquées dans de nombreux processus biologiques parmi lesquels : la prolifération cellulaire et l'hypertrophie. En observant les coupes de reins colorés à l'hématoxine-éosine; nous avons notés que les souris MRL/lpr avaient des augmentations de taille des glomérules et de microtubules. Le but de ce travail est de montrer que l'hypercatabolisme du GMPc chez la souris MRL/lpr serait associé au remodelage tissulaire favorisant l'hypertrophie de certains organes.

#### **Contribution des auteurs :**

Le Dr Claire LUGNIER a supervisé ce travail de recherche et assuré la révision de l'article scientifique. L'équipe de Dr Sylviane MULLER (MONNEAUX Fanny, DECOSSAS Marion, Muller Sylvian) s'est occupé des animaux. Dr DECOSSAS Marion a participé à la confection des frottis et a supervisé les études histologiques et immuno- histologiques. ABUSNINA Abdurrazag a participé à la réalisation des expériences de Q-RT PCR. KERAVIS Thérèse a contribué dans l'encadrement techniques et à l'interprétation des résultats. Pour ma part, j'ai réalisé l'ensemble du travail expérimental, mis au point et adapté les techniques de RT-PCR, de dosage du GMPc, réalisé les différentes expériences et rédigé la première version de l'article scientifique.

**Cyclic GMP catabolism up-regulation in MRL/lpr lupus prone mice is associated to organ remodeling.**

YOUGBARE Issaka, KERAVIS Thérèse, ABUSNINA Abdurraza, MONNEAUX Fanny, DECOSSAS Marion, Muller Sylviane, LUGNIER Claire.

UMR CNRS 7213, Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 67401, Illkirch Cedex, France

**Corresponding author:**

Claire Lugnier, Université de Strasbourg, CNRS UMR 7213, Biophotonique et Pharmacologie, 74 Route du Rhin, BP 24, 67401 Illkirch, France.

Tel: (+33) 368 854 264, Fax: (+33) 368 854 313, E-mail: [Claire.lugnier@unistra.fr](mailto:Claire.lugnier@unistra.fr)

**Key Words:** Systemic lupus erythematosus, PDE1, PDE2, mRNA, protein expression, activity, cGMP, kidney, spleen, liver, organomegaly.

**Abstract:**

High production of several antibodies against molecular components of the nuclear compartment is a hallmark of systemic lupus erythematosus (SLE), an autoimmune disease characterized by the progressive chronic inflammation of multiple joints and organs. Organ damage and dysfunction are the clinical features of SLE with worse prognosis at the end stage of disease. Cell hypermetabolism and hypertrophy can accelerate organ dysfunction. In this study we investigate the role cGMP catabolism in organ remodelling of main target tissue of SLE (kidney, spleen and liver) in MRL/lpr mice (SLE model) in comparison with control mice. The cGMP-PDE activities in 15 week old of age SLE mice were significantly increased in kidney (3 fold,  $p < 0.001$ ), spleen (2 fold,  $p < 0.001$ ) and liver (1.6 fold,  $p < 0.05$ ). These increases were related to increased activity of PDE1 in kidney and liver; as well as of PDE2 in spleen of lupus-prone mice in comparison with same aged control mice. Data revealed PDE1 expressions and activity up regulations in MRL/lpr mice kidneys that are associated with glomerula and tubule sizes increases leading to nephromegaly. Up regulation of PDE1 in both kidney and liver and PDE2 in spleen were associated to low intracellular cGMP levels. These results suggest that, according to the SLE-affected organ, PDE1 and/or PDE2 inhibition can be therapeutic strategies for SLE treatment.

## 1. Introduction

Systemic lupus erythematosus (SLE) is an autoimmune disease characterized by production of a lot of antibodies targeted nuclear compartment: spliceosome, phospholipids and nucleus (shoenfeld Y., 2007). This disease is also characterized by the progressive chronic inflammation of multiple joints and organs. The clinical future of lupus consists of renal failure, thrombosis and neurologic troubles. Massive splenomegaly has also been reported as a manifestation of SLE (González-Condey B. A et al., 2008, Harris A. A, et al., 2009). In addition, recent findings revealed that mesangial cell proliferation appears to play an important role in the pathogenesis of progressive glomerular abnormalities, leading to glomerulosclerosis and renal failure (Cheng J et al., 2004). MRL/lpr lupus-prone mice (characterized by Fas mutation) developed clinical symptoms like human with multiple organomegaly. Fas mutation lead to immune tolerance and autoimmune diseases in both human and mouse (Nagata S, et al 1995). Fas and Fas ligand are implicated in cell death by apoptosis. In the last decays some studies indicated that kidney and spleen volume increasing are due to lymphocytes infiltration into inflammatory site (Kai S. and Klaus L., 2003). Nevertheless histology studies of these target organs in lupus shown increased number of cell type leading to hyperplasia or increased size of cell. But poor is known on cell proliferation or hypertrophy in MRL/lpr mice organomegaly during disease progression. Cell hypermetabolism and hypertrophy can accelerate organ dysfunction (Colmegna I., et al 2005). Downstream receptor activation cyclic nucleotide phosphodiesterases play a pivotal role in cAMP and cGMP signalling. This superfamily of enzymes hydrolyses cAMP and cGMP as a feedback mechanism to return to basal levels. In mammals, 11 PDEs families are currently known (PDE1– PDE11); most of them consist of several isozymes and numerous PDE isozyme-splice variants. All PDEs share a structural feature of a catalytic core, and they differ in substrate affinity (cAMP and / or cGMP), kinetic properties, specific inhibitor sensitivity and allosteric regulators (Lugnier, 2006). By regulating cyclic nucleotides levels, PDE contributes to their compartmentalisation and governs many biological process among them cell adhesion, proliferation and migration. Calcium/calmodulin (Ca/CaM) activated-PDE1 has been reported to play important role in cell proliferation and implicated in rodent heart hypertrophy (Miller C L. et al., 2009, Mokni et al., 2010). We previously reported increased activity and expression of PDE1 in kidney of cirrhotic rat after bile duct ligation (Tahseldar-Roumieh et al., 2009) and also up regulation of PDE hydrolyzing cGMP (PDE2, PDE5) when bovine aortic endothelial cells (PDE1, PDE2 and PDE5; Keravis T. et al, 2000) or human

umbilical vein endothelial cells ( PDE2; Favot L., et al 2004) undergo to proliferate toward angiogenic phenotypes. Chronic renal failure is associated with diminished nitric oxide availability and many of the biological actions of nitric oxide are mediated by cGMP (Rodriguez-Iturbe F., et al.; 2005). These observations prompt us to hypothesize that cGMP-PDE may play a role in MRL/lpr mouse nephritis and would lead to multiple organ remodelling. After investigating changes in PDE subtypes activities, we focused our analysis on cGMP-PDE mRNA and protein expressions, activities and location in MRL/lpr lupus-prone mice during disease progression in comparison with control mice.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. Material**

Female CBA/J (H-2k) and MR/lpr (H-2k) mice were 6 weeks of age purchased from Harlan (Gannat, France). All animal experiments were performed with the approval of the local Institutional Animal Care and Use Committee (CREMEAS). For PDE activity assessment, cGMP, Tris, EGTA and EHNA were from Sigma (St. Louis, MO, USA). Nimodipine and DMPP0 were generous gift from Bayer (Berlin) and Pascal Grondin (Glaxo Smith Klein), respectively. [8-<sup>3</sup>H] cGMP (30 – 50 Ci mmol<sup>-1</sup>) was purchased from New England Nuclear (Boston, MA, USA) and purified by thin layer chromatography on silica gel, using isopropanol: NH<sub>4</sub>OH : H<sub>2</sub>O (70:15:15) as a solvent. Nimodipine, EHNA and DMPP0 were dissolved in dimethyl sulfoxide 100% DMSO. The final concentration of DMSO did not exceed 1% for PDE activity assessment. Antibodies for Western blot and immunohistochemistry directed to PDE1 isoforms were purchased from FabGennix Inc. (Frisco, TX, USA): Anti-PDE1A (PD1A-101AP), Anti-PDE1B (PD1B-201AP), anti-PDE1C (PD1C-301AP) and anti-PDE2A (PD). Anti-vimentin, anti-EFGR and Anti-GAPDH antibodies were obtained from Chemicon. Horse radish peroxidase-conjugates were from Promega. ECL kit was from GE Healthcare. Total RNA was isolated using RNeasy mini Kit (Qiagen) and their expression analysed by Q-PCR using BIO-RAD commercial kits (iScript<sup>TM</sup> cDNA Synthesis and iQ<sup>TM</sup> SYBR Green Supermix) in MyIQ<sup>TM</sup> thermocycler. Specific primers were obtained from Invitrogen (Table 1). Intracellular cGMP level in mice tissues was assessed using enzyme immuno-assay kit from Assay Design<sup>TM</sup> (Arbor USA).

## **2.2. Preparation of kidney, spleen and liver extracts**

CBA/J and MRL/lpr mice were sacrificed at 8, 15 and 18 weeks. Kidneys, spleen and liver were isolated, immediately frozen in liquid N<sub>2</sub> and stored at -80°C. Frozen tissues were powdered in liquid nitrogen using a mortar/pestle set-up. The resulting tissue powders were homogenized with a glass-glass potter for 3x30 s at 4°C in the following buffer: 20 mM Tris, pH 7.5, 5 mM EGTA, 150 mM NaCl, 20 mM Na-β-glycerophosphate, 1 μM H-89, 10 mM NaF, 1 mM NaVO<sub>3</sub>, 1% Triton X-100, 0.1% Tween 20, 166 μM Pefabloc, 133 μM aprotinin, 8.3 μM bestatin, 2.5 μM E64, 3.3 μM leupeptin, 1.6 μM pepstatin-A. The homogenates were centrifuged at 14,000 g for 4 min at 4°C and the supernatants were stored as aliquots at -80 °C until used. Protein concentration was determined following Lowry *et al.* (1951), using a compatible detergent assay.

## **2.3. Preparation of subcellular fractions of kidney**

Kidneys from MRL/lpr mice and their control CBA/J were ground manually in liquid nitrogen using a mortar. The powder were weighted and homogenized in lysis buffer. Subcellular compartmental proteins were extracted with Millipore kit (#2145 Millipore, France) as described by manufacture. Protein content of each fraction was determined by Lowry method (Lowry *et al.* 1951). Quality of subcellular fractionation was verified by Western blot using antibodies against protein markers: EGFR (Endothelium Growth Factor receptor) as membrane protein, vimentin as cytoskeleton, GAPDH as cytoplasm and histone H<sub>3</sub> as nuclear proteins.

## **2.4. PDE activity in kidney, spleen and liver extracts**

PDE activity was determined with a radio-enzymatic assay as described previously (Keravis *et al.*, 2005). Total cGMP-PDE activity was assessed at 1 μM cGMP and the contribution of PDE1 isozymes was determined using selective inhibitors 10 μM nimodipine, 20 μM EHNA for PDE2 and 0.1 μM DMPPPO for PDE5. Specific activities were expressed as pmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> protein.

## **2.5. cGMP level in mice tissues**

Frozen tissues were ground to a fine powder under liquid nitrogen in mortar. Tissues were weighted and homogenized in 10 volume of 0.1 M HCl. Homogenates were centrifuged

at 1000 x g at room temperature. cGMP tissue levels were determined by Assay Design™ Direct Cyclic GMP EIA Kit (Arbor, USA).

## **2.6. Analysis of PDE1, PDE2 protein expression pattern**

Protein (30 µg) from kidney, spleen and liver extracts and kidney subcellular compartments (cytoplasm, nucleus, membrane and cytoskeleton) were subjected to Western blot as described previously (Campos-Toimil *et al.*, 2008). Briefly, protein samples were denatured and solubilized for 5 min at 95°C in Laemmli buffer, electrophoresed on SDS-8% polyacrylamide gel and electrotransferred onto polyvinylidene fluoride membranes. Immunodetection was carried out with: anti-PDE1A (1/2500), anti-PDE1B (1/2500), anti-PDE1C (1/2500), anti-Vimentin (1/1000), anti-EGFR (1/1000) and anti-GAPDH (1/60 000). Immobilized antigens were detected by chemiluminescence using secondary antibodies coupled to horse-radish peroxidase-conjugates as (1/60,000), an ECL kit and autoradiography films. Autoradiography signals were captured on a GeneGenius Bio Imaging System (Syngene) using the GeneSnap software and analysed using the GeneTools software. Statistical analysis was done with the one-way analysis of variance and the Bonferroni's multiple comparison tests.

## **2.7. Kidney PDE1 isoforms and spleen PDE2A mRNA expressions by Q-PCR**

Frozen tissues were ground in liquid nitrogen using mortar. The resulting tissue-powders was homogenised with glass-glass Potter 3 x 30 s at 1500 rpm in Qiazol lysis buffer. Total RNA was extracted with Qiagen kit as described by manufacture. RNA integrity and quality was verified in 4% agar gel, and its quantity assessed by spectrophotometry at 240 nm (Genequant Pharmacia). 1µg of total RNA was retro-transcript in cDNA for amplification in real time PCR using MyIQ (Biorad). Specific primers were designed using consensus sequences of all variant given (Pubmed) of each subtype of PDE family. Consensus sequences were obtained with multiple alignments by Mafft version 6 (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/online/server/>). Specific primers of interested conserved sequence were designed with Primer3 Input (version 0.4.0) . These primers allowed us to amplify in real time PCR, 1:20 of cDNA using iQ™ SYBR Green Supermix kit (Bio-Rad) and MyIQ™ thermocycler (Biorad). Amplicon length comprises between 150-200 bp were verified in 4% agar gel.



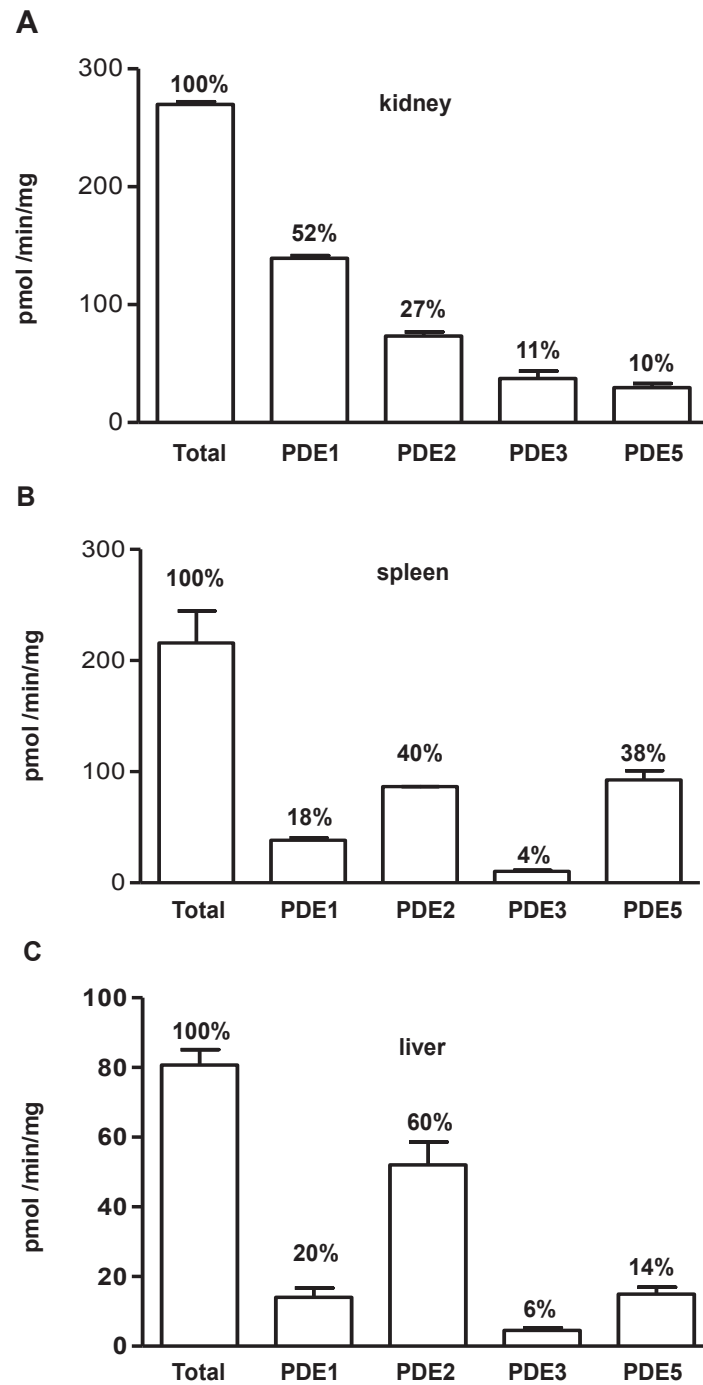
## **2.8. Histology**

The kidneys (mice of 15 week of age) were harvested and fixed in the buffered formalin (10 %, pH 7.0) for 48 h. The samples were embedded in paraffin and dehydrated in 70 to 100 % ethanol/xylene. Sections were cut at 2–4  $\mu\text{m}$  thickness, deparaffinised, and stained with hematoxylin and eosin. Pathological changes in the kidneys were assessed, including the number of lymphocytes infiltration, size of glomeruli and microtubules with Image J.

## **3. Results**

### **3.1. Characterization of cGMP-PDE activity in kidney, spleen and liver of 8 week-old CBAJ control mice.**

Figure 1 shows that kidney and spleen have a comparable level of total cGMP-PDE activity and twice as much as in liver. PDE1 was the main cGMP hydrolysing isozyme in kidney (52%). PDE2 contribution was important in spleen (40%) and PDE2 is the main cGMP hydrolysing isozyme in liver (60%). PDE5 contribution was important in spleen (38%) and lower in kidney and liver tissues (14%).



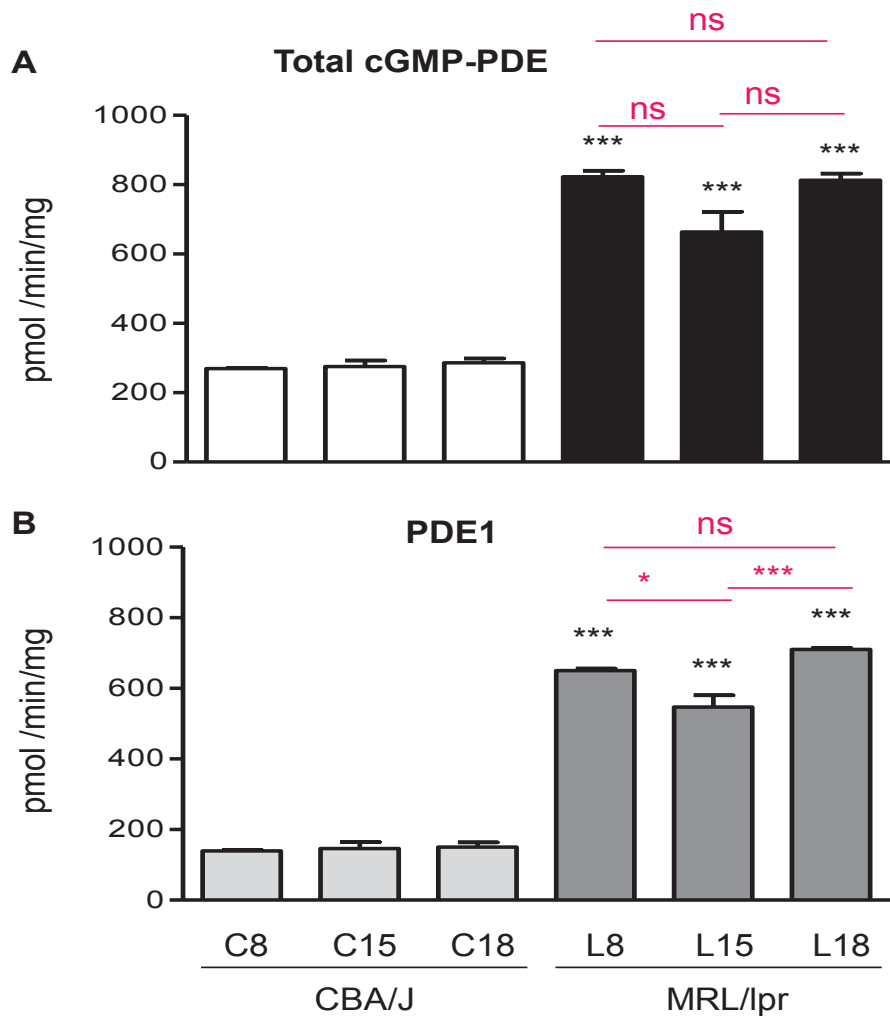
**Figure 1: Pattern of cGMP-PDE activities in kidney (A), spleen (B) and liver (C) of 8 week-old CBA/J control mice.** Total cGMP-PDE activity and relative contribution of PDE1, PDE2, PDE3 and PDE5 isozymes were assessed at  $1\mu\text{M}$  cGMP as described in methods section. Data are expressed as pmol/min/mg of protein and are the mean  $\pm$  s.e.m. of 3 independent experiments.

### **3.2. Evolutions of cGMP-PDE activities in kidney, spleen and liver with disease progression of MRL/lpr lupus-prone mice.**

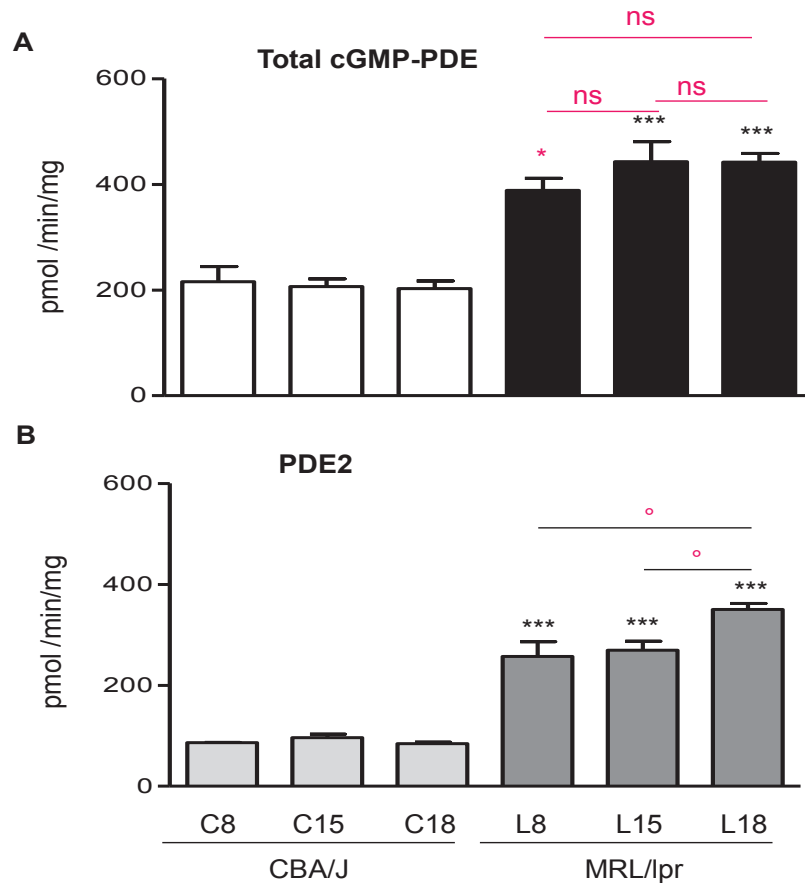
cGMP-PDE activities were assessed in kidney (Figure 2), spleen (Figure 3) and liver (Figure 4) of 8, 15 and 18 week-old CBA/J control and MRL/lpr lupus-prone mice. Total cGMP-PDE activity in kidney (Figure 2A), spleen (Figure 3A) and liver (Figure 4A) did not significantly vary with the age of CBA/J control mice while it significantly increased in MRL/lpr lupus-prone mice. This increase was due to PDE1 in kidney (Figure 2B; about 4.5-fold) and in liver (Figure 4B; about 2-fold) and to PDE2 in spleen Figure 3B; 2 to 3-fold). PDE1 activity in kidney and liver was already increased in 8 week-old lupus-prone mice and remained increased over disease progression. However, PDE2 activity in spleen significantly increased with disease progression between 15 and 18 weeks. There were no significant changes (not shown): i) in kidney and liver PDE2 activities; ii) in kidney, spleen and liver PDE5 activities. Further investigations were performed on 15 week-old mice, the PDE activities of the CBAJ control and the MRL/lpr lupus-prone tissues being quite stable and the disease being already well established and before life degradation (Lacotte S., et al., 2010).

### **3.3. Cyclic GMP levels in kidney, spleen and liver**

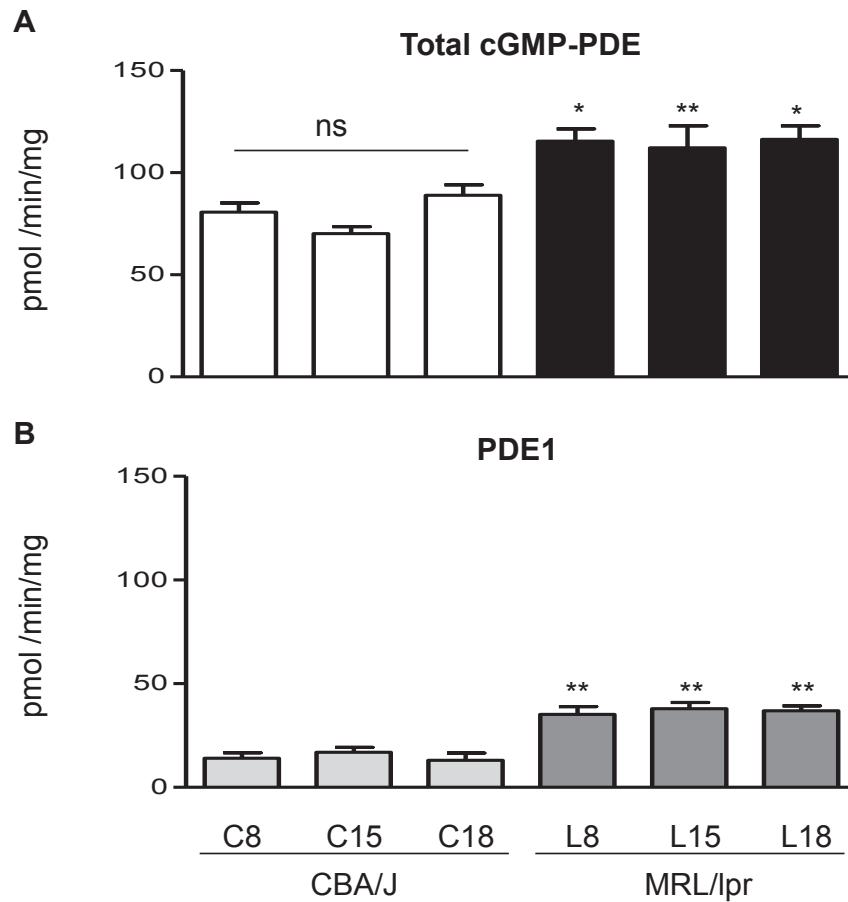
Figure 5 shows that cGMP level in CBA/J control kidney was about 30-fold higher compared to liver and spleen. In MRL/lpr lupus-prone tissues, cGMP level was significantly decreased by 56% in kidney and 41% in spleen and liver, in agreement with the above reported increases of cGMP-PDE activities.



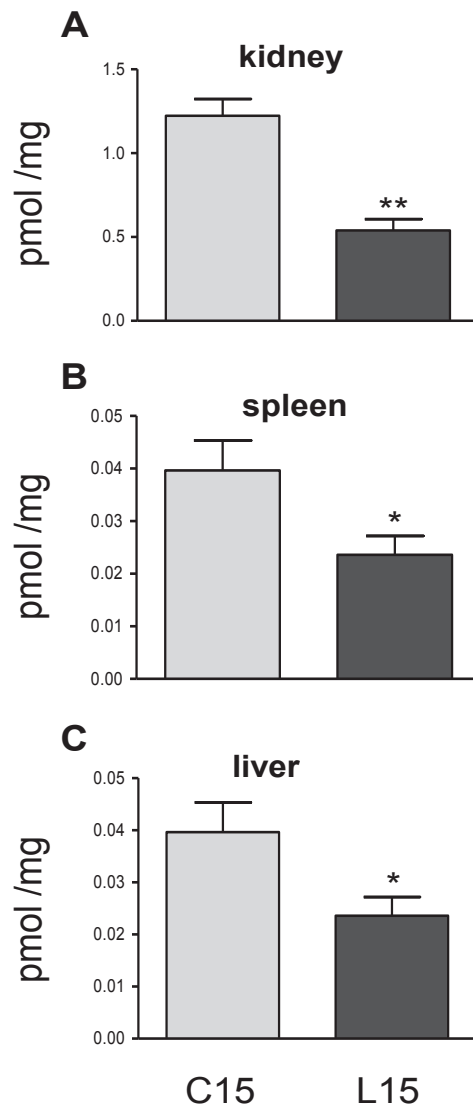
**Figure 2: Pattern of total cGMP-PDE activity (A) and PDE1 (B) in kidney of CBA/J control and MRL/lpr lupus-prone mice of various age 8, 15 and 18 weeks.** Total cGMP-PDE activity and contribution of PDE1 were assessed at  $1\mu\text{M}$  cGMP as described in Material and Methods in kidneys of 8, 15 and 18 week-old CBA/J control (C8, C15, C18) and 8, 15 and 18 week-old MRL/lpr lupus-prone (L8, L15, L18) mice. Data are expressed as pmol/min/mg of protein and are the mean  $\pm$  s.e.m. of 3 independent experiments. In comparison with the respective controls \*\*\*:  $P < 0.001$ .



**Figure 3: Pattern of total cGMP-PDE activity (A) and PDE2 (B) in spleen of CBA/J control and MRL/lpr lupus-prone mice.** Total cGMP-PDE activity and contribution of PDE2 were assessed at  $1\mu\text{M}$  cGMP as described in Material and Methods in spleen of 8, 15 and 18 week-old CBA/J control (C8, C15, C18) and 8, 15 and 18 week-old MRL/lpr lupus-prone (L8, L15, L18) mice. Data are expressed as pmol/min/mg of protein and are the mean  $\pm$  s.e.m. of 3 independent experiments. In comparison with the respective controls \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ . In comparison within the MRL/lpr °:  $P < 0.05$



**Figure 4: Pattern of total cGMP-PDE activity (A) and PDE1 (B) in liver of CBA/J control and MRL/lpr lupus-prone mice.** Total cGMP-PDE activity and contribution of PDE1 were assessed at 1 $\mu$ M cGMP as described in Material and Methods in liver of 8, 15 and 18 week-old CBA/J control (C8, C15, C18) and 8, 15 and 18 week-old MRL/lpr lupus-prone (L8, L15, L18) mice. Data are expressed as pmol/min/mg of protein and are the mean  $\pm$  s.e.m. of 3 independent experiments. In comparison with the respective controls ns: not significant; \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$



**Figure 5: Intracellular cGMP level in kidney (A), spleen (B) and liver (C) of CBA/J control and MRL/lpr mice.** cGMP level was assessed as described in methods section in 15 week-old CBA/J control (C15) and MRL/lpr lupus-prone (L15) mice. Results are expressed in pmol cGMP /mg of protein and are mean  $\pm$  s.e.m. of 3 independent experiments. In comparison with control \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .



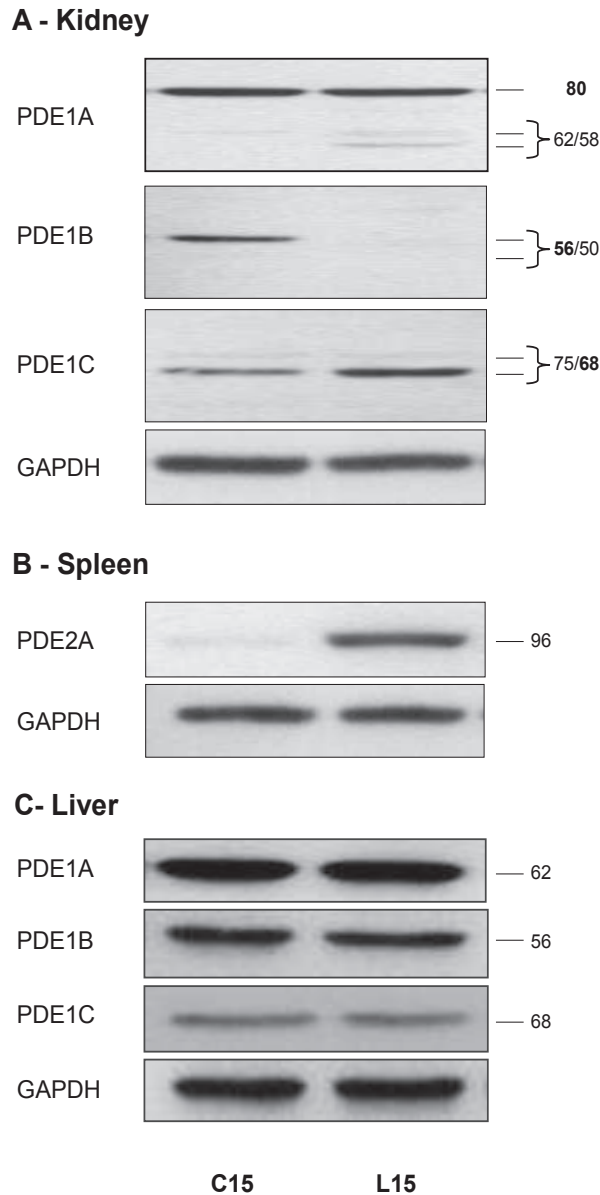
### 3.4. PDE1 and PDE2 expressions in kidney, spleen and liver

Expression pattern in kidney revealed a major 80 kDa-PDE1A signal in both control and lupus-prone mice (Fig.6A and 7A); a 58 kDa-PDE1A signal was induced in lupus-prone mice (Fig. 6A). The major signals for PDE1B (56 kDa) and for PDE1C (68 kDa) were respectively down and up regulated in kidney of lupus-prone mice (Figs. 6A, 7C and 7E). PDE1B (Fig.7D) and PDE1C (Fig.7F) mRNA expressions were significantly increased in kidney of MRL/lpr lupus-prone mice by 2.7 and 3.4-fold, respectively. Expression pattern in spleen revealed a 96 kDa-PDE2A in control mice and was increased by 8-fold in lupus-prone mice (Figs.6B and 8A). PDE2A-mRNA of lupus-prone mice spleen was increased by 5.6-fold (Fig. 8B). Liver Western blot analysis (Fig. 6C) revealed the expression of PDE1A (62 kDa), PDE1B (56 kDa) and PDE1C (68 kDa) without any significant changes in either protein or mRNA expression (not shown) in lupus-prone mice.

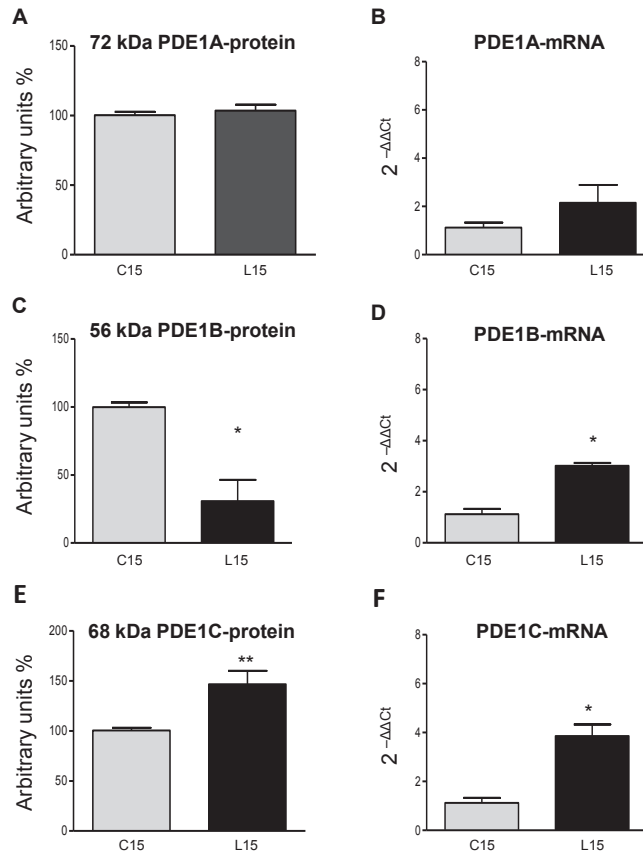
### 3.5. Sub-cellular distribution of PDE1 in kidney

The major 80 kDa-PDE1A signal seen in the extract was detected in all four subcellular fractions. While this signal was decreased in nucleus (n), membrane (m) and cytoskeleton (s) fractions of lupus-prone mice, it was increased in cytoplasmic fraction of lupus-prone mice (Fig. 9, first line panels). The major 56 kDa-PDE1B signal seen in the extract was detected in nucleus, membrane and cytoskeleton fractions but not in cytoplasmic fraction (Fig. 9, second line panels). The major 68 kDa-PDE1C signal seen in the extract was essentially detected in the cytoplasmic fraction (Fig.9, third line panels).

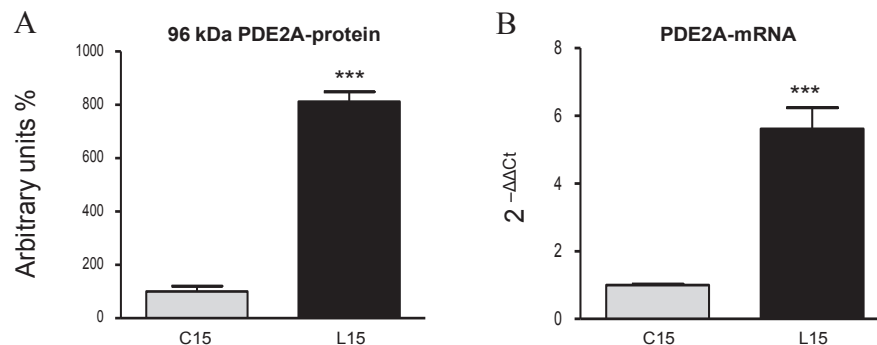
Western blot on sub-cellular fractions from kidney revealed that cytoplasmic PDE1 isoforms (PDE1A and PDE1C) protein expression are increased in SLE mouse kidney. PDE1A had multiple variants in nuclear fraction (80, 72, 62 and 58 kDa,) and a 80 kDa-protein appeared to be the main PDE1A subtype expressed in nucleus. In control mice, PDE1A is expressed in 4 compartments (cytoplasm, nucleus, membrane and cytoskeleton). In the same animals PDE1B are mostly detected in nucleus and membrane and PDE1C appeared to be mainly present in cytoplasm. Unexpectedly, PDE1A and PDE1B isozymes in SLE kidney are down regulated in the membrane, nuclear and cytoskeleton fractions. Furthermore, in the nucleus, PDE1A decreased with extinction of 72 kDa variant in SLE mice. In the membrane fraction PDE1A expression decreased with extinction of 62 kDa variant as well as PDE1B variants (56 and 50 kDa) became undetectable in SLE mice.



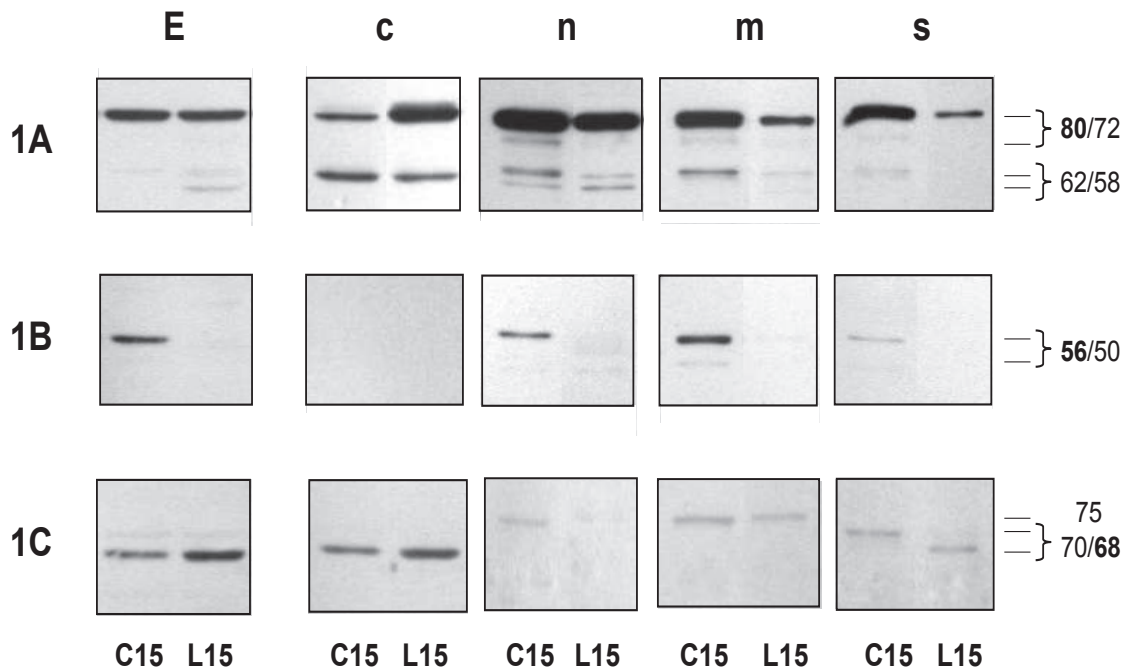
**Figure 6: Pattern of PDE1 expression in kidney of CBA/J control and MRL/lpr lupus-prone mice.** PDE1A (A,B), PDE1B (C, D) and PDE1C (E,F) expressions were assessed by Western blot (A, C, E) and Q-RT-PCR (B, D, F) as described in Material and Methods in kidneys of 15 week-old CBAJ control (C15) and MRL/lpr lupus-prone (L15) PDE1-protein expressions were normalized to GAPDH expression and results are expressed in arbitrary units in % (A) or in % of control (C, E) and are mean  $\pm$  s.e.m. of 3 independent experiments. PDE1-mRNA expressions were normalized to  $\beta$ -actin expression and results are expressed in fold change of control (B, D, F) and are mean  $\pm$  s.e.m. of 3 independent experiments. In comparison with control \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .



**Figure 7: Pattern of PDE1 expression in kidney of CBA/J control and MRL/lpr lupus-prone mice.** PD (A,B), PDE1B (C, D) and PDE1C (E,F) expressions were assessed by Western blot (A, C, E) and Q-RT-PCR (B, D, F) as described in Material and Methods in kidneys of 15 week-old CBAJ control (C15) and MRL/lpr lupus-prone (L15) PDE1-protein expressions were normalized to GAPDH expression and results are expressed in arbitrary units in % (A) or in % of control (C, E) and are mean  $\pm$  s.e.m. of 3 independent experiments. PDE1-mRNA expressions were normalized to  $\beta$ -actin expression and results are expressed in fold change of control (B, D, F) and are mean  $\pm$  s.e.m. of 3 independent experiments. In comparison with control \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ .



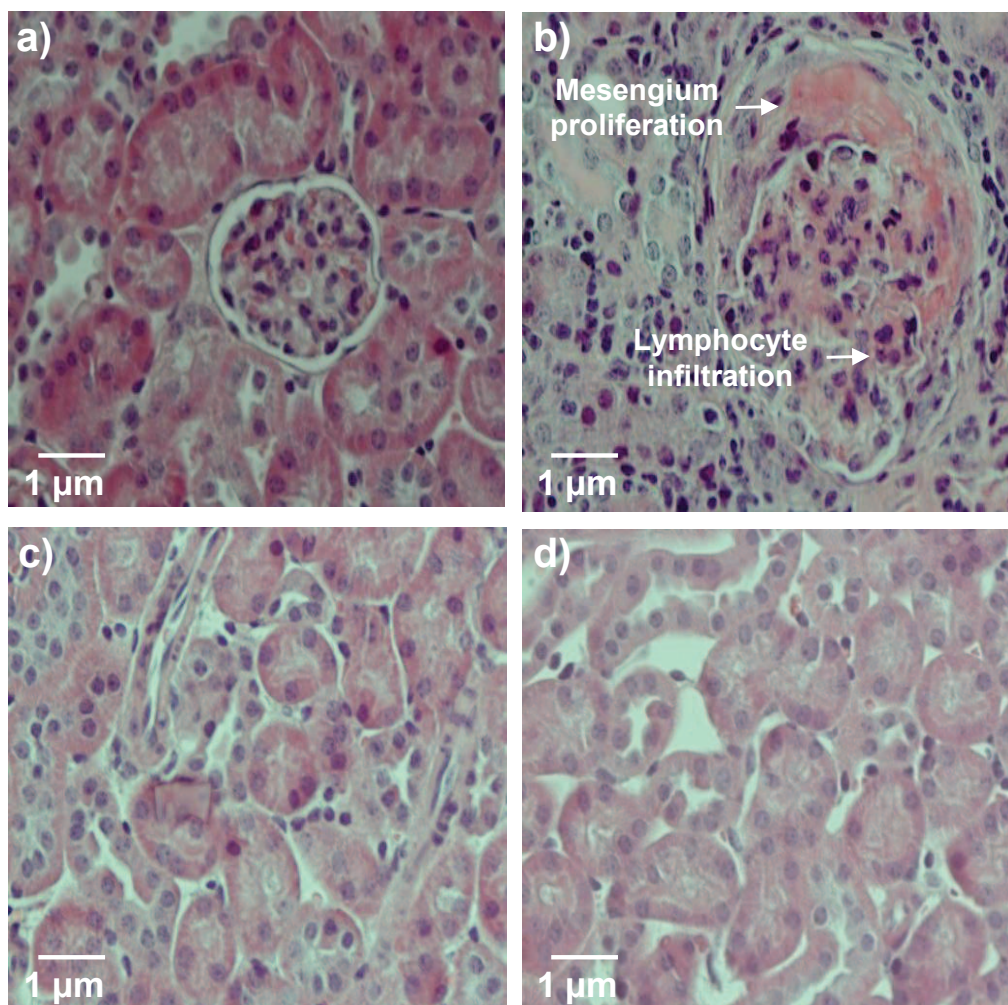
**Figure 8: Pattern of PDE2 expression in spleen of CBA/J control and MRL/lpr lupus-prone mice.** PDE2A expressions were assessed by Western blot (A) and Q-RT-PCR (B) as described in Material and Methods in spleen of 15 week-old CBAJ control (C15) and MRL/lpr lupus-prone (L15) mice. PDE2-protein expression was normalized to GAPDH expression and results are expressed in arbitrary units in % of control and are mean  $\pm$  s.e.m. of 3 independent experiments. PDE2-mRNA expression was normalized to  $\beta$ -actin expression and results are expressed in fold change of control and are mean  $\pm$  s.e.m. of 3 independent experiments. In comparison with control \*\*\*:  $P < 0.001$ .



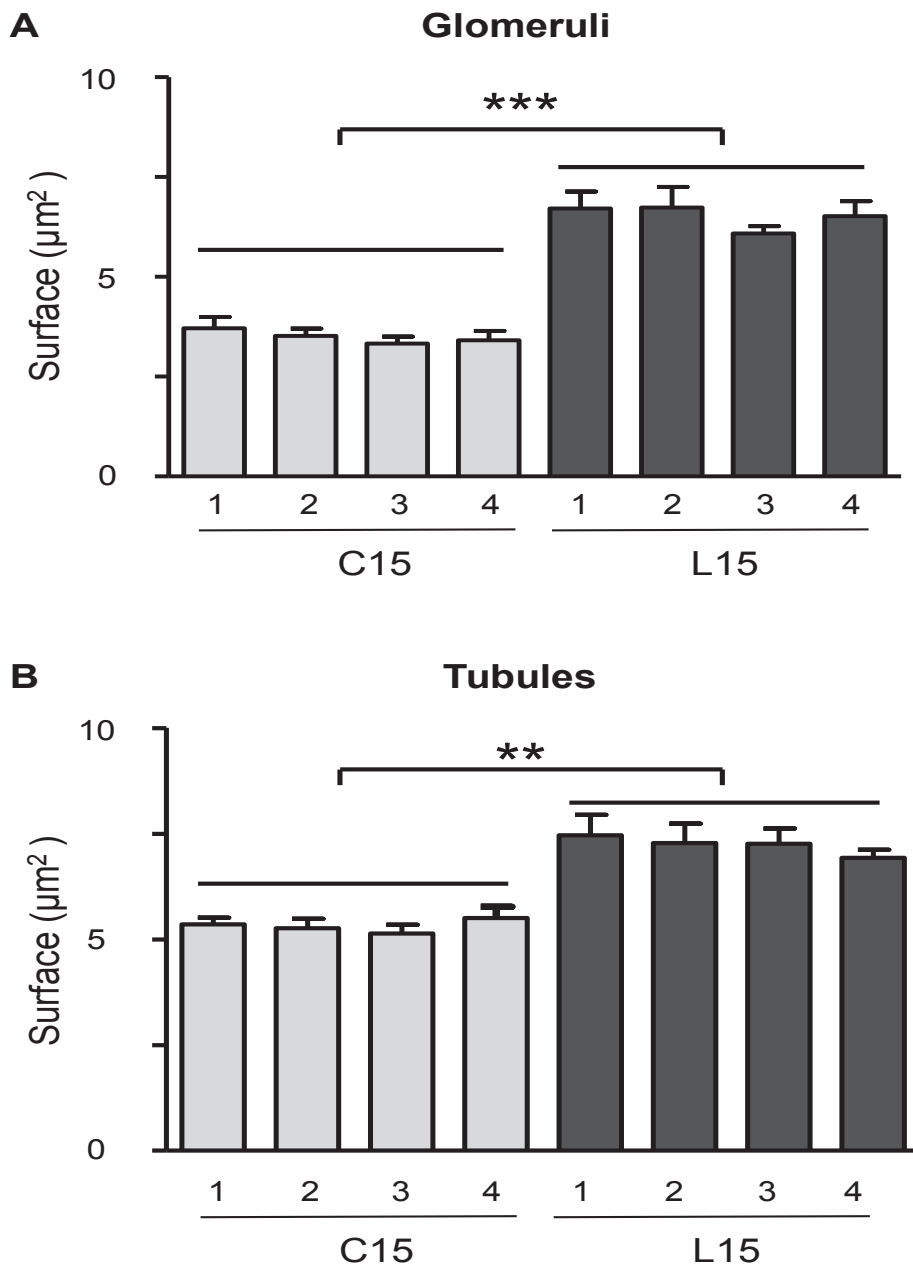
**Figure 9: Subcellular localization of PDE1 isozymes in kidneys of 15 week-old CBA/J control and MRL/lpr lupus-prone mice.** Subcellular fractions from kidneys were prepared and subjected to Western blot analysis as described in Material and Methods. Cytoplasm (c), nucleus (n), membrane (m) and skeleton (ck) fractions were analyzed with anti-PDE1A, anti-PDE1B and anti-PDE1C specific antibodies. Band sizes are given in kDa. Traces shown are representative of  $n = 3$  experiments.

### 3.6. Kidney histology

The kidney section staining with eosin-hematoxylin revealed an increased size of glomeruli (Fig. 10 b) and microtubules (Fig. 10 d) in MRL/lpr lupus-prone mice. Also, MRL/lpr lupus-prone mouse kidney exhibited increased proliferation of mesangial cells with a lot of lymphocytes present in the glomeruli (Fig. 10 b). Sizes of glomeruli and microtubules were estimated by surface measurements and Figure 11 shows that both glomeruli and microtubules surfaces were significantly increased in MRL/lpr lupus-prone mice.



**Figure 10: Comparative glomerulus and tubule histology in kidneys of 15 week-old CBA/J control and MRL/lpr lupus-prone mice.** Glomeruli (a, b) and tubules (c, d) in kidneys of 15 week-old CBA/J control (a, c) and MRL/lpr lupus-prone (b, d) mice were analyzed after eosin–hematoxylin staining, as described in Material and Methods. Pictures were captured with a 40-fold magnification.



**Figure 11: Comparative glomerulus and tubule sizes in kidneys of 15 week-old CBA/J control and MRL/lpr lupus-prone mice.** Sizes of glomeruli (A) and tubules (B) in kidneys (n = 4) of 15 week-old CBA/J control (C15) and MRL/lpr lupus-prone (L15) mice were analyzed as described in Material and Methods.

## 4 Discussion

During disease progression, MRL/lpr lupus mice developed chronic inflammation leading to multiple tissue damage affecting several organ remodelling. Previous studies revealed that lymphoproliferation (lpr) mutation, which is a leaky mutation in Fas, induces in mouse massive production of lymphocytes. Furthermore, the Fas null mice shown substantial liver hyperplasia, lymphadenopathy and splenomegaly (Nagata S., et al 1995). We first curiously observed increased volume of MRL/lpr kidney, liver and spleen compared to control. Protein levels were much higher in lupus-prone mice tissue extracts than in control for the same mass tissue weighted. These indications suggest us to greatly consider hypermetabolism occurring in lupus. Protein levels were higher in lupus-prone mice tissue extracts than in the control, when expressed relatively to tissue weight. In this study, We show, in comparison with control animals, that PDE1 activity in lupus mice is increased around 4.5-fold in their kidney and 2.8-fold in liver, meanwhile, PDE2 activity is increased 4-fold in spleen. Some studies have shown cGMP-PDE alteration related to PDE1A in diseases such as in kidney dysfunctions (Thaseldar Roumié et al., 2009) and heart hypertrophy (Miller C.L., 2009; Mokni et al., 2010). Similarly in agreement with our data on PDE1, it has been reported an higher PDE1 contribution to total cGMP-PDE activity in polycystic kidney diseases characterized by mural epithelial cell proliferation (Wang X., et al.; 2009). We think that these upregulation of PDE1 activities in both kidney and liver and also of PDE2 activity in spleen can be related to cell proliferation and resistance to death apoptosis. Indeed, Fas mutation, a gene encoding for membrane receptor (TNF $\alpha$  cytokine family), is implicated in cell apoptosis. Lupus cells are resistant to TNF $\alpha$ -induced apoptosis and may undergo to proliferate in a chronic inflammation context (Shi X. et al., 2002). Our study demonstrates implication PDE1 activities and expressions in lupus nephromegaly and splenomegaly. Cheng J. et al., 2004 have reported that PDE3 inhibitor reduces cultured mesengial cell proliferation. Nevertheless, we does not found any significant change in PDE3 activity, that minimally contributes to cAMP- or cGMP-PDE (Thaseldar-Roumié et al., 2009) strengthening PDE1 implication. The present study reveals a significant increase in PDE1 activity (in kidney and liver) and PDE2 activity (spleen) that are associated with lower cGMP tissue levels in MRL/lpr kidneys in comparison with control kidneys. cGMP pool in MRL/lpr kidney is regulated by PDE1 that has been previously shown as the major cGMP-PDE in rat kidney (Thaseldaar-roumieh et al., 2009). Apoptosis mediated by Fas- FasL pathway is positively correlated with intracellular cGMP increase (Hayden M.A., et al 2001). These authors reported that apoptosis increased in both human and rat pulmonary artery smooth muscle cells



(PASMCs) in response to 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate (cGMP) stimulation. These findings support closely our data as we found high cGMP-PDE activities and low cGMP tissue levels associated with increased organs remodelling that might be due to lower apoptotic cell death. In rat heart hypertrophy induced by angiotensin II, there is PDE1 activity up-regulation (Mokni et al., 2010) associated with declined cGMP level (Miller C.L., et al 2009). Reduced cGMP level in cell is suspected to initiate cell hypermetabolism and protein accumulation. Interestingly our results concerning increase in both PDE1 and PDE2 activities in SLE were supported by increases of their protein and mRNA expressions. 62 kDa-PDE1A, 56 kDa-PDE1B and 68 kDa-PDE1C are expressed in control kidney and PDE1C are is significantly increased in MRL/lpr mice. Furthermore, two additive PDE1A variants (72 and 58 kDa) are induced in lupus prone-mice kidney. The high increase in PDE1 activity appears to be mainly due to PDE1C subfamily and also to induction of two other PDE1A variants, although in kidney PDE1B expression is significantly decreased. PDE2A protein and mRNA expressions were also increased respectively 8 fold and 5.6 in MRL/lpr mice spleen compared to control. We have detected 62 kDa-PDE1A, 56 kDa-PDE1B and 68 kDa-PDE1C in liver, but we did not found any change of both PDE1 protein and mRNA expression in liver.

The subcellular fractionation of kidney tissue allowed us to investigate alterations of PDE1 isoform distribution during disease progression. Cytoplasmic PDE1A and PDE1C expressions upregulated in MRL/lpr mice kidney. Interestingly PDE1A, 1B and 1C expression are decreased in membrane, nuclear and only PDE1A in cytoskeletal compartment, favouring an increase of PDE1A and PDE1C in cytosol. PDE1A is found in the 4 compartments, PDE1B is mainly located in nucleus and membrane and PDE1C is mainly in cytoplasm. Interestingly, PDE1C is significantly increased at mRNA and protein levels in MRL/lpr mouse kidney. These data suggest that this increase participates to vascular smooth muscle cell proliferation as previously reported (Rybalkin SD, 2002). Glomeruli consist of one third of mesangial cells and PDE1overexpression in these cells might explain mesangial proliferation induced glomerulomegaly (Zhu Y et al., 2006). Furthermore, kidney section with staining eosin hematoxylin consistently revealed proliferation of mesangium in MRL/lpr mice glomeruli. Mesengial cell play important role in kidney function (filtration) but their proliferation underlines epithelial-to-mesenchymal transition leading to renal fibrosis (Zeisberg M et al., 2004). Our results suggest that alteration of cGMP signalling in MRL/lpr kidney, spleen and kidney may be lead to cell hyperplasia; and further organ seize increased as well as other signal alterations. Very interestingly, it was recently shown that serum

antiguanosine antibodies are markers for SLE disease activity and pathogen potential (Colburn and Green, 2006). Our reported upregulation of cGMP catabolism by PDE1 and PDE2 might result in guanosine upregulation and consequently antiguanosine antibody production. All together our data reveal that upregulation of cGMP catabolism is very important in the development of lupus diseases, notably in organomegaly. It will be of interest to investigate the effect of cGMP-PDE inhibitor treatment on lupus multiple organomegaly and disease progression.

### **Conclusion:**

This study shows up-regulation of PDE1 activity in both MRL/lpr mice kidney and liver whereas PDE2 activity is upregulated in spleen. Up-regulation of PDE1 and PDE2 activities is supported by their protein and mRNA expressions increasing in lupus-prone mice. PDE1A protein overexpression in kidney was linked to apparition of new variants in kidney. Subcellular kidney fractionation indicates that PDE1A might be mainly cytoplasmic. In both case, we found that increased PDE1 or PDE2 activities were closely correlated with decreased cGMP tissue levels. Lupus-prone mouse kidney exhibits high proliferation of mesengium and PDE1 may play a pivotal role in the turnover of cell mitogenesis as previously shown in other studies. Further investigation is needed to understand FAS/cGMP signalling alteration in lupus. PDE1 and PDE2 inhibition could be potential therapeutic strategies for prevention of nephromegaly and/or splenomegaly in lupus.

## References

- (1) Ahloulay M, Bankir L, Lugnier C, Le Bec A, Poirel O, Moreau R, Lebrec D. Cyclic AMP-phosphodiesterases inhibitor improves sodium excretion in rats with cirrhosis and ascites. *Liver Int* 2005;25:403-409.
- (2) Cheng J, Thompson MA, Walker HJ, Gray CE, Diaz Encarnacion MM, Warner GM, Grande JP. Differential regulation of mesangial cell mitogenesis by cAMP phosphodiesterase isozymes 3 and 4. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;287:F940-53.
- Colburn KK, Green LM. Serum antiguanosine antibodies as a marker for SLE disease activity and pathogen potential. *Clin Chim Acta*. 2006;370:9-16
- (3) Colmegna I, deBoisblanc BP, Gimenez CR, Espinoza LR. Slow development of massive splenomegaly, portal and pulmonary hypertension in systematic lupus erythematosus: can nodular regenerative hyperplasia of the liver explain all these findings? *Lupus* 2005;14:976-978.
- (4) Gonzales-Conde y Borbon A, Ortega Gonzales G, Molina Boix M, Ramos Freixa J, Aleman Lorenzo A. Massive splenomegaly as a manifestation of systemic lupus erythematosus. *Rev Clin Esp* 1986;178:413-414.
- (5) Harris A. A, Kamishima T, Horita T, Atsumi T, Fujita N, Omatsu T, Onodera Y, Terae S, Koike T, Shirato H. Splenic volume in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2009;18:1119-1120.
- (6) Favot L, Keravis T, Lugnier C. Modulation of VEGF-induced endothelial cell cycle protein expression through cyclic AMP hydrolysis by PDE2 and PDE4. *Thromb Haemost* 2004;92:634-645.
- (7) Keravis, T., Thaseldar-Roumie R, Lugnier C. Assessment of phosphodiesterase isozyme contribution in cell and tissue extracts. In :Methods Mol Biol (C. Lugnier, ed) (2005) vol 307 pp 63-74.
- (8) Favot, L., Keravis, T. and Lugnier, C. Modulation of VEGF-induced endothelial cell cycle protein expression through cyclic AMP hydrolysis by PDE2 and PDE4. *Thromb Haemost* (2004) 92, 634-645.
- (9) Lacotte S, Dumortier H, Decossas M, Briand JP, Muller S. Identification of New Pathogenic Players in Lupus: Autoantibody-Secreting Cells Are Present in Nephritic Kidneys of (NZBxNZW)F1 Mice. *J Immunol* 2010;184:3937-3945.
- (10) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 1951 Nov;193(1):265-75.
- (11) Lugnier C. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase (PDE) Superfamily: A new target for the development of Specific Therapeutic Agents. *Pharmacol & Ther* (2006) 109, 366-398.
- (12) Miller CL, Oikawa M, Cai Y, Wojtovich AP, Nagel DJ, Xu X, Xu H, Florio V, Rybalkin SD, Beavo JA, Chen YF, Li JD, Blaxall BC, Abe J, Yan C. Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-

stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 in mediating cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res* 2009;105:956-964.

Mokni W, Keravis T, Etienne-Selloum N, Walter A, Kane MO, Schini-Kerth VB, Lugnier C. Concerted regulation of cGMP and cAMP phosphodiesterases in early cardiac hypertrophy induced by angiotensin II. *Plos One* 2010, in press

(13) Rodriguez-Iturbe B, Ferrebuz A, Vanegas V, Quiroz Y, Espinoza F, Pons H, Vaziri ND. Early treatment with cGMP phosphodiesterase inhibitor ameliorates progression of renal damage. *Kidney Int* 2005;68:2131-2142.

(14) Rybalkin SD, Rybalkina I, Beavo JA, Bornfeldt KE. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C promotes human arterial smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* 2002;90:151-157.

(15) Shi X, Xie C, Kreska D, Richardson JA, Mohan C. Genetic dissection of SLE: SLE1 and FAS impact alternate pathways leading to lymphoproliferative autoimmunity. *J Exp Med* 2002;196:281-292.

(16) Shoenfeld Y. The diversity of autoantibodies to P-ribosomal: the infectious-autoimmunity plot. *J Mol Med* 2007;85:907-909.

(17) Singbartl K, Ley K. Leukocyte recruitment and acute renal failure. *J Mol Med* 2004;82:91-101.

(18) Tahseldar-Roumieh R, Ghali-Ghoul R, Lugnier C, Sabra R. Effect of phosphodiesterase 5 inhibitor on alteration in vascular smooth muscle sensitivity and renal function in rats with liver cirrhosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H481-8.

(19) Tahseldar-Roumieh R, Keravis T, Maarouf S, Justiniano H, Sabra R, Lugnier C. PDEs1-5 activity and expression in tissues of cirrhotic rats reveal a role for aortic PDE3 in NO desensitization. *Int J Exp Pathol* 2009;90:605-614.

(20) Tsuruda T, Hatakeyama K, Masuyama H, Sekita Y, Imamura T, Asada Y, Kitamura K. Pharmacological stimulation of soluble guanylate cyclase modulates hypoxia-inducible factor-1alpha in rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 297(4):H1274-80. Epub 2009

(22) Zeisberg M, Kalluri R. The role of epithelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis. *J Mol Med* 2004;82:175-181.

(23) Zhu Y, Yao J, Meng Y, Kasai A, Hiramatsu N, Hayakawa K, Miida T, Takeda M, Okada M, Kitamura M. Profiling of functional phosphodiesterase in mesangial cells using a CRE-SEAP-based reporting system. *Br J Pharmacol* 2006;148:83

### **III.4 Manuscrit 4 : NCS 613, a potent and specific PDE4 inhibitor, displays anti-inflammatory effects on human lung tissues (soumis AJP).**

#### **Mise en contexte :**

L'inflammation chronique est un processus délétère qui survient dans de nombreuses affections pulmonaires récurrentes comme l'asthme et la BPCO (Morin C, 2009). Elle provoque un déclin des fonctions respiratoires à cause de la fibrose qui est à l'origine de l'hypersécrétion de mucus et de la destruction des alvéoles (Tang, et al., 2006). La destruction du parenchyme pulmonaire caractérisée par l'emphysème et l'obstruction des bronchioles sont des changements pathologiques survenant dans ces affections pulmonaires. Ces changements sont du point de vue fonctionnel caractérisés par une inflammation progressive des voies respiratoires résultant de la prolifération cellulaire, du remodelage tissulaire et de l'obstruction des bronches. Les phosphodiésterases type 4 (PDE4) jouent un rôle crucial dans la pathogenèse de l'inflammation en métabolisant l'AMPc dans les leucocytes, l'endothélium et l'épithélium au niveau du poumon humain (Brown, et al., 2007, Burgess, et al., 2006). Il a été montré chez la souris que la PDE4C est impliquée dans l'inflammation pulmonaire dû au tabagisme et que l'augmentation du taux d'AMPc intracellulaire avait un effet anti-inflammatoire. De même, l'exposition maternelle secondaire à la fumée entraînent une induction de la phosphodiésterase-4D5 et exacerbation de la réponse immunitaire de type Th2 dans le poumon (Singh, et al. ; 2009). De plus les PDE4s jouent un rôle important dans le maintien de la tonicité des muscle lisses des voies respiratoires (Rousseau et al., 1995, Campos-Toimil, et a., 2000) ; d'où les implications dans l'hyperréactivité qui survient dans l'asthme. Dès lors les PDE4 sont désignées comme des cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de l'asthme et la BPCO et certains inhibiteurs de PDE4s sont en phases cliniques. Bien qu'un grand intérêt soit porté sur cette famille d'enzyme hydrolysant majoritairement l'AMPc dans la cellule, il existe peu de littérature portant sur la caractérisation de l'activité AMPc-PDE et l'expression des isoformes de PDE4 dans le poumon humain. Le but de ce travail est de montrer le rôle fonctionnel *in vitro* des PDE4 dans l'inflammation pulmonaire et l'hyperréactivité bronchique en utilisant un inhibiteur spécifique de PDE4, le NCS 613.

**Contribution des auteurs :** Le Dr Éric Rousseau a supervisé ce travail de recherche et assuré la révision de l'article scientifique. Le Dr Marco Sirois a permis le recrutement des sujets qui ont participé à cette étude. Dr Edmond Rizcallah et l'ensemble des techniciens du laboratoire

de pathologie nous ont permis de récupérer les échantillons de poumon vivant dans des conditions optimales et ils ont fait les analyses macroscopiques des tissus pulmonaires résiduels. Dr Caroline Morin et Farid Yannick Senouvo ont contribué à la microdissection des bronchioles humaines et artères pulmonaires. Dr Claire LUGNIER a initié le projet de collaboration et a supervisé les expériences sur la caractérisation des PDE dans le poumon. Pour ma part, j'ai réalisé l'ensemble du travail, mis au point les techniques pour le fractionnement subcellulaire et la culture organoïde du parenchyme pulmonaire et rédigé l'article scientifique.

**NCS 613, a potent and specific PDE4 inhibitor, displays anti-inflammatory effects on human lung tissues.**

**Issaka Yougbare<sup>1, 4</sup>, Caroline Morin<sup>1</sup>, Farid Yannick Senouvo<sup>1</sup>, Chantal Sirois<sup>2</sup>, Roula Albadine<sup>3</sup>, Claire Lugnier<sup>4</sup> and Eric Rousseau<sup>1</sup>.**

<sup>1</sup>Le Bilarium, Department of Physiology and Biophysics, <sup>2</sup>Service of Thoracic Surgery and <sup>3</sup>Department of Pathology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada

<sup>4</sup>UMR CNRS 7213, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie, Faculté de Pharmacie, Université de Strasbourg, 67401, Illkirch Cedex, France.

**CORRESPONDING AUTHOR: DR ERIC ROUSSEAU**

Le Bilarium

Department of Physiology and Biophysics,

Faculty of Medicine and Health Sciences,

Université de Sherbrooke

3001, 12<sup>th</sup> Avenue North,

Sherbrooke, J1H 5N4, QC, Canada

Tel: (819) 564-5306

Fax: (819) 564-5399

Email: [Eric.Rousseau@USherbrooke.ca](mailto:Eric.Rousseau@USherbrooke.ca)

**Running head:** PDE4 inhibitor reduces lung inflammation.

**Keywords:** lung, PDE4 isozymes, lung inflammation, airways hyperresponsiveness.

**Abstract:**

Chronic inflammation is a hallmark of pulmonary diseases which leads to lung parenchyma destruction (emphysema) and obstructive bronchiolitis occurring in both COPD and asthma. Inflammation is strongly correlated with low intracellular cAMP levels and increase in specific cAMP hydrolyzing activity. The aim of the present study was to investigate the role of the cyclic phosphodiesterase PDE4 in human lung and to determine the effects of NCS 613, a new PDE4 inhibitor, on lung inflammation and bronchial hyperresponsiveness. High cAMP-PDE activities were found in the cytosoluble fractions from human lung parenchyma, pulmonary artery and distal bronchi. PDE4 (rolipram sensitive) represented 40, 30 and 56 % of total cAMP-PDE activities in the above-corresponding tissues. Moreover, PDE 4A, 4B, 4C and 4D isoforms were detected in all 3 subcellular fractions (cytosolic, microsomal and nuclear) with differential distributions according to specific variants. Pharmacological treatments with NCS 613 significantly decreased PDE4 activity and reduced I-KB $\alpha$  degradation in cultured parenchyma, both of which are usually correlated with a lower inflammation status. Moreover, NCS 613 pretreatment potentiated isoproterenol-induced relaxations in human distal bronchi, while reducing TNF $\alpha$ -induced hyperresponsiveness in cultured bronchi, as assessed in the presence of Methacholine, U-46619, or Histamine. This reducing effect of NCS 613 on human bronchi hyperresponsiveness was related to a lower expression level of PDE4B and 4C, as well as a down-regulation of phospho-CPI-17 which, in turn, may involve p38-MAPK and NF $\kappa$ B pathways. In conclusion, specific PDE4 inhibitors, such as NCS 613, may represent an alternative and isoform-specific approach toward reducing human lung inflammation.



## **Introduction:**

Lung parenchyma destruction resulting from chronic inflammation and leading to emphysema and obstructive bronchiolitis are typical pathological changes related to both COPD (21, 27) and asthma (5, 34). These pathologies are functionally characterized by progressive airway inflammation, resulting in mucus secretion, cell proliferation, airway remodeling and obstruction (6, 7). Downstream of surface membrane receptor activation, cyclic nucleotide phosphodiesterases play a pivotal role in cAMP and cGMP signaling (8). This superfamily of enzymes hydrolyses cyclic nucleotides as a feedback mechanism for returning local nucleotide concentration to basal levels. In mammals, 11 families of PDE are currently identified (PDE1–PDE11), most of which consist of several isozymes and numerous PDE isozyme-splice variants. While all PDEs share a common structural feature of a catalytic core, they differ however in substrate affinity, kinetic properties, specific inhibitor sensitivity and allosteric regulation (11, 16). By regulating local cyclic nucleotide levels, PDE contributes to their compartmentalization and governs many biology processes, including proliferation, inflammation and regulation of smooth muscle tone (9, 20).

Phosphodiesterase type 4 (PDE4) has been suggested to be a critical factor in the pathogenesis of inflammation by metabolizing cAMP in human leukocytes and in both endothelial and epithelial lung tissues (3, 4). In animal, human and cell models, PDE4 implication has been reported in lung diseases related to chronic inflammation such as smoking-induced lung injury, fibrosis, asthma and COPD (7, 16, 21). It is well known that maternal exposure to secondhand cigarette smoke primes the lung for induction of phosphodiesterase-4D5 isozyme and exacerbated Th2 responses (32). In addition, cAMP and cGMP are also important second messengers associated with the control of smooth muscle relaxation (28). Mobilization of  $\text{Ca}^{2+}$  from intracellular stores or from the extracellular space triggers and maintains ASM tone, while relaxation is usually associated with activation of cyclic nucleotide signaling pathways, which regulate the interaction between myosin and actin as well as  $\text{Ca}^{2+}$  re-uptake (29). The functional role of PDE in ASM tone has also been demonstrated in mice deficient in the PDE4D gene which are believed to be refractory to muscarinic cholinergic stimulation (22). Consequently, PDE4 is thought to play a key role in lung inflammation and hyperresponsiveness. Despite increasing evidences which depict PDE4 family enzymes as attractive targets for treatment of asthma and COPD (5, 21), little is known regarding their relative activities and expression in human lung tissue (15, 34, 39).

The main objectives of this study were i) to characterize subcellular cAMP-PDE activities and PDE4 isoform expression in human lung parenchyma and ii) to assess whether NCS 613, a specific PDE4 inhibitor (1, 2), is able to modulate inflammation in human lung parenchyma and hyperresponsiveness triggered in distal bronchi. Herein, we report cAMP-PDE activities and for the first time the subcellular expression of PDE4 isozymes in human lung parenchyma, as well as anti-inflammatory effects of NCS 613 on this tissue. We also report the functional role of PDE4 in controlling smooth muscle tone derived from human pulmonary arteries and distal bronchi.

## **Material and methods**

### **2.1. Materials**

cAMP, EGTA and EHNA were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA). [<sup>3</sup>H]-cAMP and [<sup>3</sup>H]-cGMP were from New England Nuclear (Boston, MA, USA). Rolipram (a generous gift of Schering, Berlin, Germany), cilostamide (from Sigma) and NCS 613 (1, 2) were dissolved in dimethyl sulfoxide (100 % DMSO); the final concentration of DMSO did not exceed 1 % for PDE activity assessment and 0.1 % for tension measurements. All PDE antibodies were from FabGennix Inc. (Frisco, TX, USA): anti-PDE4A (DP4-112AP), anti-PDE4B (PD4-201P), anti-PDE4C (PD4-301P) and anti-PDE4D (PD4-401P). Anti-GAPDH (#MAB374) was from Chemicon/Millipore. Anti-I<sub>K</sub>B<sub>α</sub> was from BD-Bioscience, anti-phospho-CPI-17 and anti-total CPI-17 were from Upstate (NY). Anti-p38-MAPK and anti-β-actin were from NEB-Cell Signaling. Horse radish peroxidase-conjugates were from Promega. ECL kit was from GE-Healthcare.

### **2.2. Preparation of human parenchymal subcellular fractions.**

Cytosolic (**c**), microsomal (**m**) and nuclear (**n**) enriched fractions were prepared from human lung parenchyma as described previously (17, 18). The study was approved by our institution's Ethical Committee (Protocol number CRC 05-088). Human lung explants were obtained from 14 patients aged between 50-60 years undergoing surgery for lung carcinoma resection. Tissue samples were collected from fresh lobectomy, transported to the laboratory in physiological Krebs's solution (24). Briefly, 20 g of lung parenchyma were homogenized with a Polytron (1 x 30 seconds at 8 000 rpm followed by 2 x 30 seconds at 13 500 rpm) in 80 ml of the following buffer (in mM): 300 sucrose, 20 K-PIPES, 3 K-EGTA, 0.1 diisopropylfluorophosphate (DIFP), 2 dithiothreitol, 1 ascorbic acid, plus 1 pepstatin, 1

leupeptin and 2.5 UI/ml aprotinin, pH 7.4, and centrifuged at 6 500 x g for 20 min in a TI 42.1 rotor (Beckman) at 4 °C. The first pellet containing nuclei and mitochondria was kept in ice while the first supernatant was filtered through two layers of cheesecloth and centrifuged 1h at 85 000 x g in a TI 42.1 rotor at 4°C. The supernatant from the second centrifugation was thereafter pooled and aliquoted as cytosolic (**c**) fraction, while the corresponding pellet was re-suspended in a preservation buffer (in mM) : 300 sucrose, 400 KCl, 1 K-EGTA, 5 K-PIPES, 0.1 MgCl<sub>2</sub>, 0.1 di-isopropylfluorophosphate (DIFP), pH 7.4; and preserved as the microsomal (**m**) fraction. The first pellet was thereafter re-suspended in 2.4 M sucrose pH 7.2 and filtered through four layers of cheesecloth and centrifuged 15 min at 1 000 x g. This mixture was progressively dehydrated with 2.2 M sucrose and centrifuged 1h at 100 000 x g in a TI 35 rotor, at 4°C. The supernatant was discarded and the pellet, comprising the nuclear (**n**) fraction, was re-suspended in the preservation buffer described above and stored as 50 µl aliquots. All samples were frozen in liquid nitrogen and stored at – 81°C for subsequent use.

### **2.3. Preparation of human distal bronchi and pulmonary artery extracts**

Either fresh or cultured distal bronchi and pulmonary arteries from human lung were homogenized with a Polytron (1 x 30 seconds at 8 000 rpm followed by 2 x 30 seconds at 13 500 rpm) in the following buffer (in mM): 300 sucrose, 20 K-PIPES, 3 K-EGTA, 0.1 di-isopropylfluorophosphate, 2 dithiothreitol, 1 ascorbic acid, plus 1 pepstatin, 1 leupeptin and 2.5 UI/ml aprotinin, pH 7.4, and centrifuged at 10 000 x g for 10 min at 4°C. Supernatant aliquots were stored at -80 °C until use. These cytosolic extracts were used for PDE assay and Western blot analysis (24).

### **2.4. Assessment of PDE activities in lung tissue**

PDE activity was measured by a radioenzymatic assay as previously described (13) at a substrate concentration of 1 µM cAMP or cGMP in presence of 10,000 cpm [<sup>3</sup>H]-cAMP or [<sup>3</sup>H]-cGMP as tracer and hydrolyzed between 10 to 20 %. Contribution of the different isozymes to PDE activities were assessed with either 1 µM cGMP in the presence of 10 µM nimodipine for PDE1, 20 µM EHNA for PDE2 and 0.1 µM DMPPPO for PDE5 or with 1 µM cAMP in the presence of 1 µM cilostamide for PDE3 and 10 µM rolipram for PDE4. Alternatively, NCS 613 (0.1-10 µM) was used as a PDE4 inhibitor, as previously reported (1, 2). All samples were also tested in presence of 1 mM of EGTA and 1 µM of substrate for cAMP-PDE or cGMP-PDE total activity. Protein concentration assessment enabled to

calculate specific activity in pmol/min/mg of protein. The remaining activity in presence of a specific inhibitor was subtracted from total activity for each PDE family contribution.

## **2.5. Western blot analysis**

Proteins from subcellular fractions derived from either lung parenchyma or human distal bronchi (30  $\mu$ g) were subjected to Western blot analysis. Briefly, protein samples were solubilized and denatured for 5 min at 95°C in Laemmli buffer, electrophoresed on SDS 10 % polyacrylamide gel and electrotransferred onto polyvinylidene fluoride membranes. Immunodetection was carried out with: anti-PDE4A, anti-PDE4B, anti-PDE4C, anti-PDE4D, anti-I $\kappa$ B $\alpha$ , anti-phospho-CPI-17, anti-p38 MAPK, anti- $\beta$ -actin and anti-GAPDH. Immobilized antigens were detected by chemiluminescence using horseradish peroxidase conjugates as secondary antibodies, an ECL kit and autoradiography films. Autoradiography signals were captured on a GeneGenius Bio Imaging System (Syngene) using the GeneSnap software and analyzed using the GeneTools software.

## **2.6. Isolation and organ culture of human lung tissue.**

Human lung tissues were obtained from patients undergoing surgery for lung carcinoma (24). After lobectomy and transport in sterile physiological saline solution, lung samples, distant from the malignant lesion, were dissected by the pathologist. The absence of tumoral infiltration was retrospectively established in all bronchi by pathological analysis. Tissue samples were immediately placed in Krebs solution containing (in mM): 118 NaCl, 4.7 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 25 NaHCO<sub>3</sub> and 11.1 dextrose; pH 7.4, previously bubbled with 95 % O<sub>2</sub> and 5 % CO<sub>2</sub> at 22°C and then immediately transported to a level 2-culture room. After removal of connective tissues and adhering parenchyma, paired rings of similar weight and length (inner diameter of 0.5 - 0.8 mm) were micro-dissected from the same bronchus or pulmonary artery segment. Bronchial or pulmonary artery rings were placed in individual wells of 24 well-culture plates, containing DMEM-F12 culture medium (1 ml/well) supplemented with 0.3 % penicillin (100 IU/ml) and streptomycin (0.1 mg/ml) (10). Culture plates were placed in a humidified incubator at 37° C under 5 % CO<sub>2</sub>. Distal bronchi explants were untreated (control) or treated (every 12 h for 48 h) with either 10  $\mu$ M NCS 613, 10 ng/ml TNF- $\alpha$  or 10 ng/ml TNF- $\alpha$  combined with 10  $\mu$ M NCS 613. Pulmonary artery explants were untreated (control) or treated (every 12 h for 24 h) with 10  $\mu$ M NCS 613.

## **2.8. Isometric tension measurements.**

The mechanical tensions induced by specific agonists were measured as previously described (24, 25). Bronchial or pulmonary artery rings were mounted in isolated organ baths (Radnoti Morovia CA), containing 6 ml of Krebs' solution at 37°C, bubbled with carbogen (95 % O<sub>2</sub> / 5 % CO<sub>2</sub>). An initial load of 0.6 g was applied to the rings. Tissues were allowed to equilibrate for 1 h in Krebs' solution and washed out every 15 minutes. Passive and active tensions were assessed using transducer systems coupled to Polyview software (Grass-Astro-Med Inc, West Warwick, RI) for facilitating data acquisition and analysis.

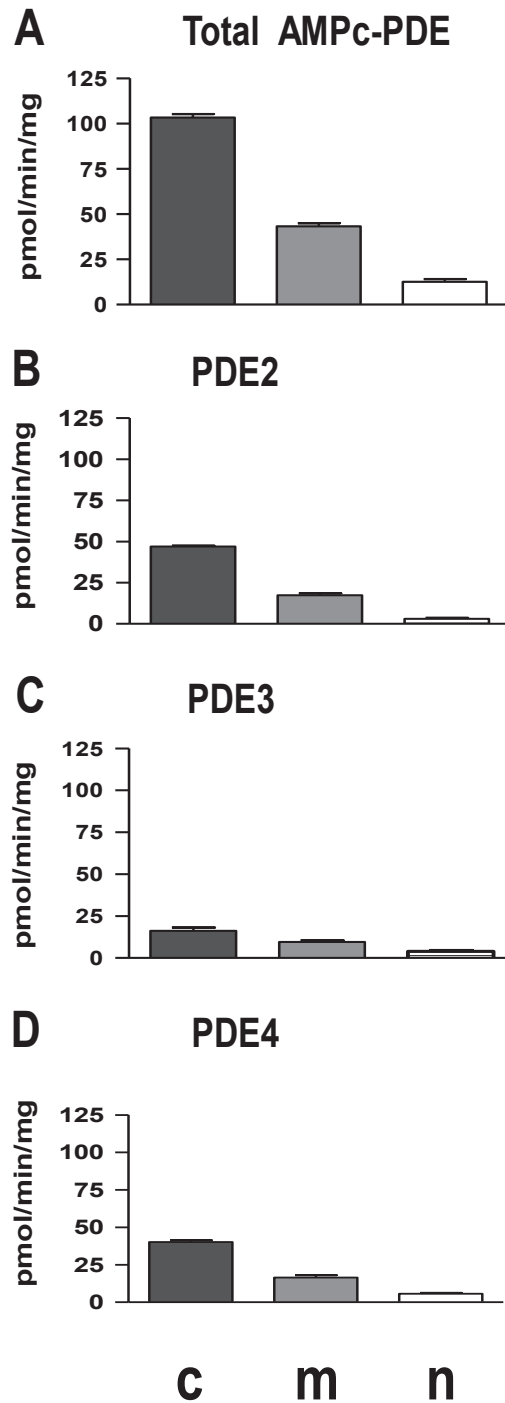
## **2.8. Data analysis and statistics**

Results are expressed as means ± S.E.M. with n indicating the number of experiments. Statistical analyses were performed using a one-way ANOVA followed by a Bonferroni post test. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . Data curve fittings were performed using Sigma Plot 9.0 (SPSS-Science, Chicago, IL) and Prism graph Pad to determine IC<sub>50</sub> values.

## **3. Results**

### **3.1. Total cAMP-PDE and specific PDE activities in subcellular parenchymal fractions.**

Total cAMP-PDE, as well as specific PDE2, PDE3 and PDE4 hydrolytic activities were detected in cytosolic (**c**), microsomal (**m**) and nuclear (**n**) subcellular fractions derived from human lung parenchyma (Fig. 1). Total cAMP-PDE activity was 100 pmol/min/mg protein in the cytosolic fraction, which was approximately 2-fold and 8-fold higher than the total activity measured in the microsomal and nuclear fractions, respectively (Fig. 1A). Of the phosphodiesterases assayed, PDE2 hydrolytic activity remained the most important cAMP-hydrolyzing enzyme detected in these three subcellular compartments, representing about 50 % of total hydrolytic activities (Fig. 1B), followed by PDE4 which displayed a similar distribution (Fig. 1D). PDE3 activity was also detected in all three subcellular fractions but to a lesser proportion than both PDE2 and PDE4 (Fig. 1C).



**Figure 1: Total cAMP-PDE and specific PDE2, 3 and 4 activities in subcellular parenchymal fractions.** Total cAMP-PDE activity and contribution of three PDE isoforms were assessed at 1 $\mu$ M cAMP by radio-enzymatic assay. **A:** Total cAMP-PDE activity was assessed in presence of 1 mM EGTA in human parenchyma subcellular fractions (**c:** cytosolic, **m:** microsomal and **n:** nuclear). **B-D:** relative distribution of PDE2 (B), PDE3 (C) and PDE4 (D) specific activity. Data are expressed as pmol/min/mg protein and represent the mean  $\pm$  s.e.m. of 3 independent experiments performed in triplicate.

### **3.2. Subcellular localization of PDE4 isoforms in human parenchyma.**

The intracellular pattern of PDE4 expression was analyzed by Western blot and revealed several PDE4 isoforms in human lung parenchyma distributed among the three subcellular fractions (Fig. 2A-D). PDE4A, 4B, 4C and 4D were detected in all 3 subcellular fractions but with differential distributions. In the cytosolic fraction (left lane), PDE4 proteins were highly expressed and contained several PDE4 isoforms, comprised mainly of PDE4A and PDE4B, whereas the microsomal fraction appeared to be enriched in a 51 kDa PDE4A variant. The nuclear fraction also contained all 4 isoforms, with PDE4B variants of 60 and 71 kDa being the most prominent (Fig. 2 A-D, right lane). Lastly, PDE4D 63 kDa was mainly present in the cytosol, whereas PDE4D 112 kDa and PDE4C 84 kDa were typical of the nuclear fraction (Fig. 2C).

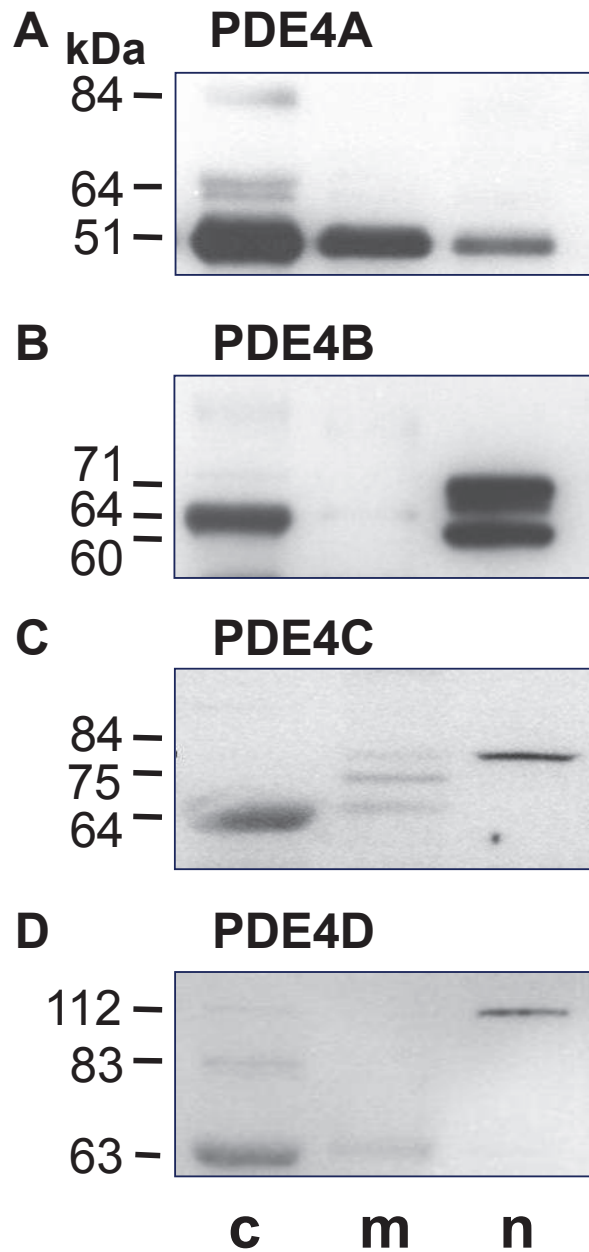
### **3.3. Effects of NCS 613 pre- treatment on PDE4 activity and I $\kappa$ B $\alpha$ expression.**

A 72 h treatment with NCS 613 induced a 64 % decrease in PDE4 activity in parenchyma (Fig. 3A). Furthermore, among the four PDE4 isoforms analyzed by Western blot, 48 h NCS 613 treatments consistently decreased the 75 kDa PDE4C isoform (Fig. 3B). In order to assess the putative anti-inflammatory effect of NCS 613, we also verified the expression of I $\kappa$ B $\alpha$ , the repressor of transcription factor NF $\kappa$ B. I $\kappa$ B $\alpha$  was largely expressed in native human parenchyma (Fig. 3C) whereas following a 72 h cultured period, I $\kappa$ B $\alpha$  was no longer detectable in cultured parenchyma (Fig. 3C, second lane). By contrast, 72 h treatments of human lung parenchyma with NCS 613 (3 and 10  $\mu$ M) rescued I $\kappa$ B $\alpha$  detection.

### **3.4. cAMP-PDE and PDE4 activities in human bronchi and pulmonary arteries**

Using cytosolic fractions, cAMP-PDE, PDE3 and PDE4 activities were detected in human distal bronchi and pulmonary arteries (Fig. 4A and B). Total cAMP-PDE activity was consistently higher in human bronchi than that measured in the cytosolic fraction of human parenchyma described above (Fig.1A). Cytosolic PDE4 controlled 56 % and 30 % of cAMP hydrolytic activity in human bronchi and pulmonary artery, respectively. Total cAMP-PDE in bronchi was approximately 2 fold higher than in pulmonary arteries, whereas bronchial PDE4 activity was 3.5 fold higher than its activity in pulmonary arteries (Fig.1A/B).





**Figure 2: subcellular location of PDE4 isoforms in human parenchyma**

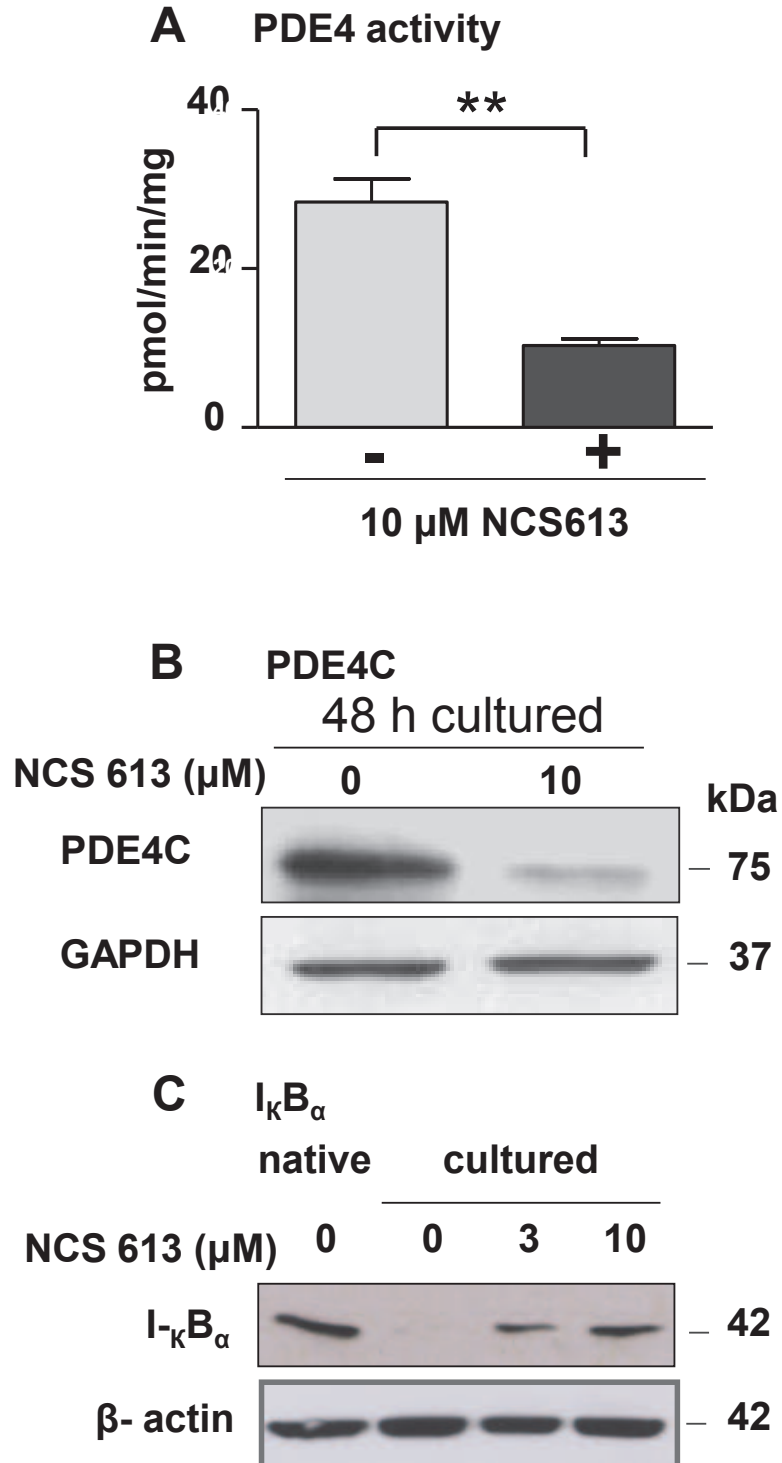
Subcellular fractions from human parenchyma were prepared and subjected to Western blot analysis as described in Methods. Cytosol (**c**), microsomal (**m**) and nuclear (**n**) fractions were probed with: **A**: anti-PDE4A, **B**: anti-PDE4B, **C**: anti-PDE4C and **D**: anti-PDE4D specific primary antibodies. Results are representative of 3 independent experiments. Note the different location patterns when comparing the distribution of PDE4 subtypes in cytosolic, microsomal and nuclear subcellular fractions.

### **3.5. Effect of NCS 613 treatment on mechanical responses of pulmonary arteries.**

Human pulmonary arteries were dissected from fresh lung resection and cultured for 24 h in the absence (control) or presence of 3  $\mu\text{M}$  NCS 613 without any destruction of the endothelium (7). Mechanical tension developed by pulmonary artery rings was measured in the presence of either 80 mM KCl or pharmacological agents. Representative superimposed recordings illustrating the tension induced by 80 mM KCl (Fig. 5A), 30 nM U-46619 (Fig. 5B) and 5 nM endothelin (Fig. 5C) revealed that NCS 613-treated tissues exhibited lower mechanical reactivity, as attested by the lower rate in both the rise and amplitude of the tonic responses. Furthermore, treated arteries became less reactive to U-46619, the TP receptor agonist as revealed by the right-shift of the trace. Mechanical responses induced by U-46619 and endothelin were normalized to the tension induced by 80 mM KCl on the same ring in order to compare mean pharmacological responses. Figure 4D shows that a 24 h treatment with NCS 613 significantly decreased the mean mechanical tension induced by either 30 nM U-46619 or 5 nM endothelin on pulmonary arteries derived from 14 lung samples.

### **3.6. Effect of NCS 613 on human bronchial hyperresponsiveness.**

TNF $\alpha$ -induced bronchi hyperresponsiveness was used as an *in vitro* model as previously reported (24, 25). TNF $\alpha$  treatments (10 ng/ml for 48 h) increased the mechanical tension induced by either 1  $\mu\text{M}$  MCh, 30 nM U-46619 or 1  $\mu\text{M}$  Histamine when compared to control cultured bronchi (24) (data not shown). Conversely, TNF $\alpha$ -treated bronchi coupled to 10  $\mu\text{M}$  NCS 613 pre-treatments resulted in a consistent reduction in reactivity and amplitude of the mechanical responses (Fig. 6A, 6B, 6C), thereby delaying the maximal amplitude. As can be seen in the representative histograms in Figure 6 (right panels) obtained from 8 different patient lungs, TNF $\alpha$  induced a hyperresponsiveness in human bronchi as shown by the significant increase in mechanical tension whereas the combination of TNF $\alpha$  and 10  $\mu\text{M}$  NCS 613 treatment significantly decreased the mean mechanical responses to all three agonists used (Fig. 6D, E and F). Finally, NCS 613 had no effect on control bronchial tissues (Fig. 6D-F; white and light-grey columns).



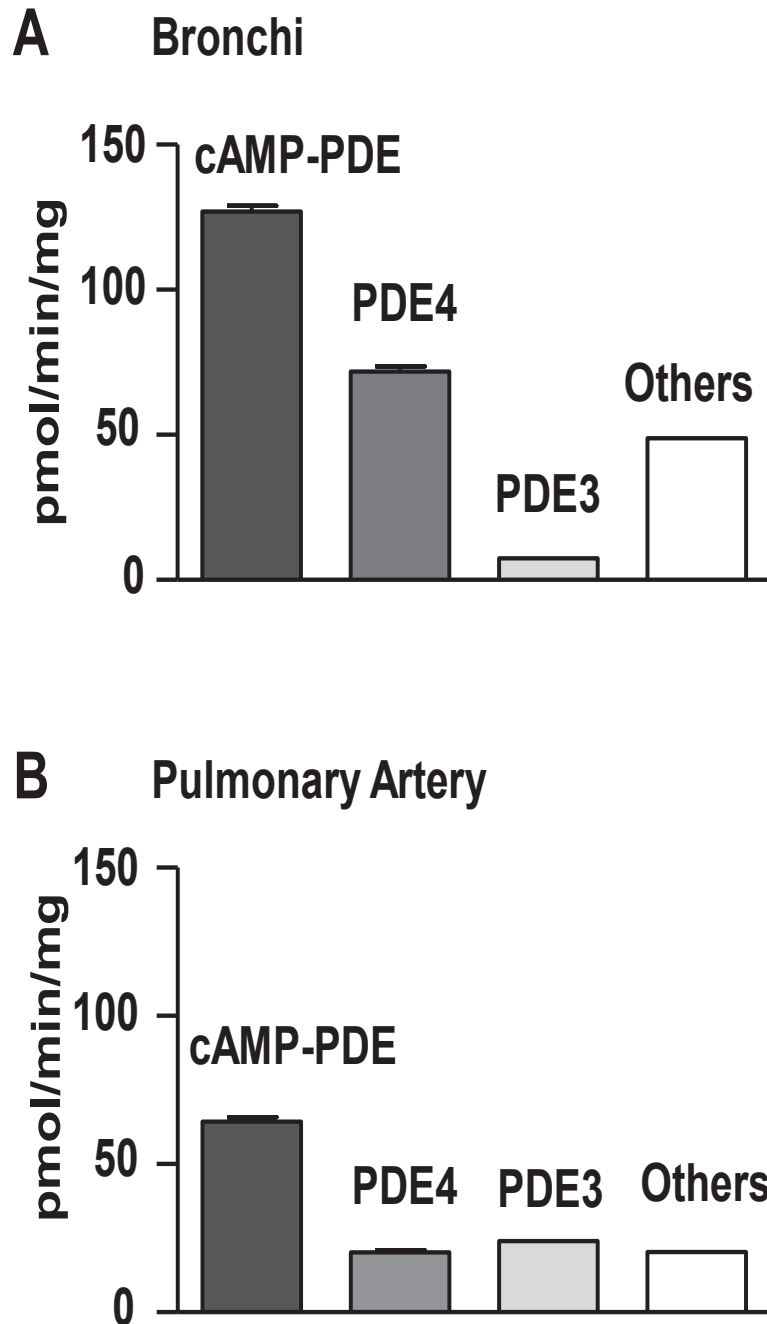
**Figure 3: Effects of NCS 613 treatment on PDE4 activity and I $\kappa$ B $\alpha$  expression in parenchyma. A:** specific PDE4 activity assessed in control and after NCS 613 treatment of parenchymal explants. **B:** PDE4C immuno-staining level in control and after NCS 613 treatment of parenchymal explants over a 48 h period. **C:** detection of cytoplasmic I $\kappa$ B $\alpha$  levels in native and cultured parenchymal explants in the absence and upon 10  $\mu$ M NCS613 treatment. Data are representative of 4 distinct experiments.

### **3.7. Effect of NCS 613 on relaxation properties of human bronchi.**

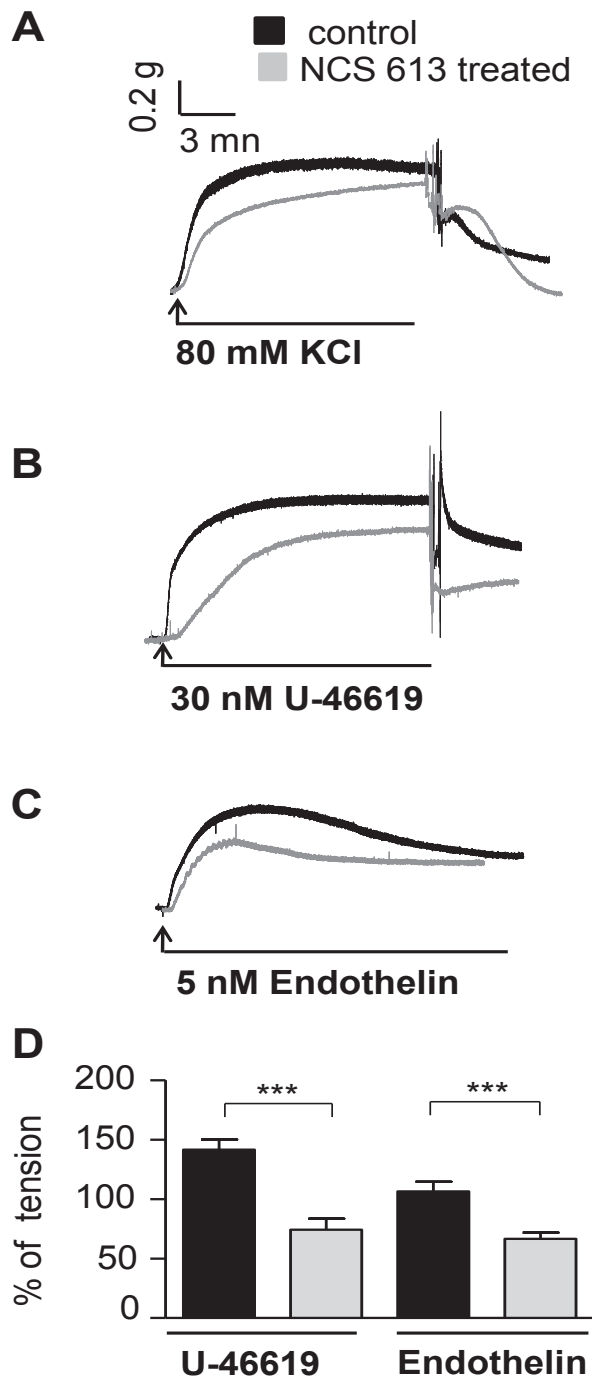
The effects of acute 10  $\mu$ M NCS 613 pre-treatments on human bronchial relaxations induced by a  $\beta$ 2 adrenoceptor-agonist were assessed on freshly dissected human bronchi. In the absence of NCS 613 treatment, the mechanical tension induced by 1 $\mu$ M Methacholine (MCh) was fully relaxed by 300 nM Isoproterenol (Fig. 7A). However, acute pretreatment with 10  $\mu$ M NCS 613 reduced the basal tension of resting bronchial rings (Fig. 7B). Of note, in the presence of 10  $\mu$ M NCS 613 treatment for 10 minutes, 100 nM Isoproterenol fully relaxed the mechanical tension induced by 1  $\mu$ M MCh (Fig. 7B). Following quantitative analysis, NCS 613 pretreatment reduced by 2-fold the apparent IC<sub>50</sub> value to Isoproterenol, from 40 nM in control bronchi to 20 nM in NCS 613-treated bronchi (Fig. 7C).

### **3.8. Effects of NCS 613 treatment on specific inflammation markers.**

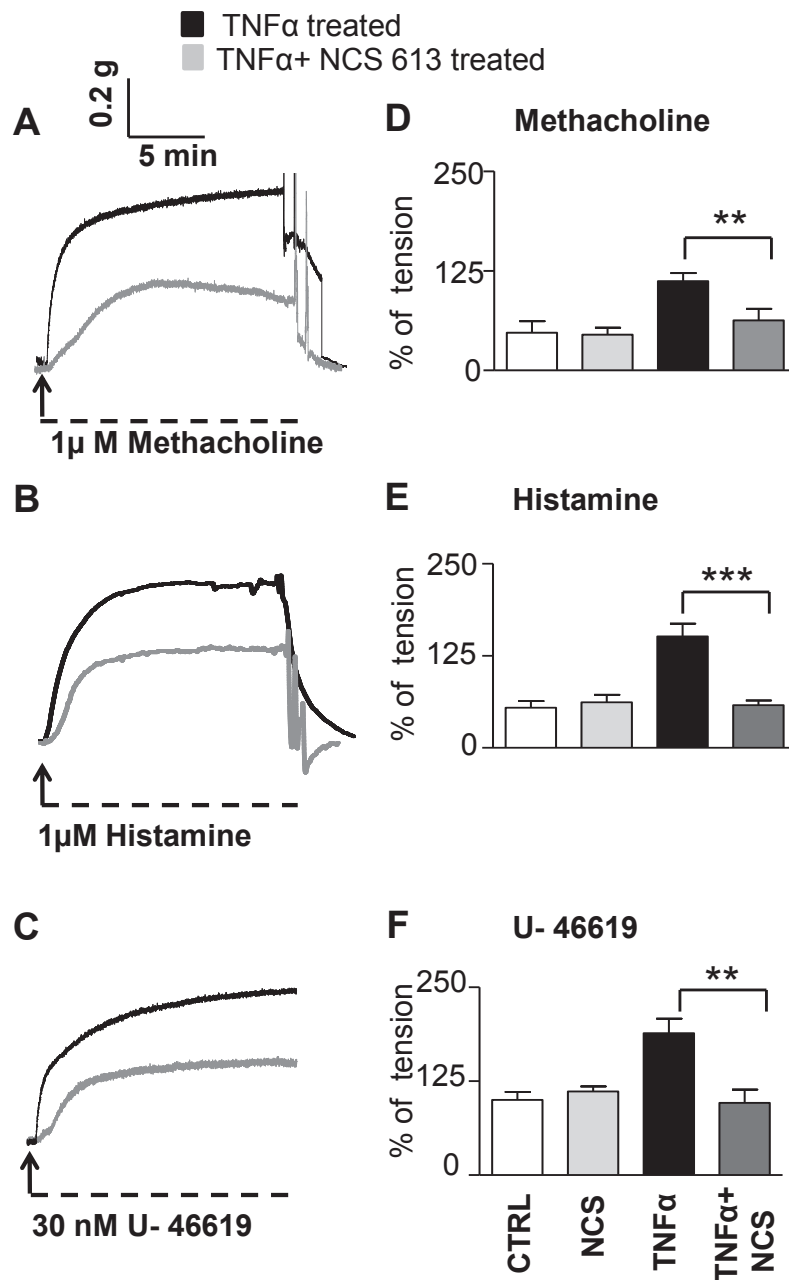
Pathways and inflammation markers putatively involved in human bronchial hyperresponsiveness were analyzed by Western blot under various experimental conditions. Compared to control conditions, TNF $\alpha$  treatment alone increased PDE4C and PDE4B protein levels (Fig. 8, top two rows), as well as p38-MAPK and phospho-CPI-17 (Fig. 8, 6<sup>th</sup> row); whereas 10  $\mu$ M NCS 613 treatments reduced the detection of protein bands enhanced by TNF $\alpha$  (fourth and third lanes respectively), including phosphorylation of p38 MAPK. Under control conditions, NCS 613 had no effect on the various immuno-staining signals (second lane). Moreover, NCS 613 treatment decreased PDE4C, PDE4B detection and phospho-CPI-17 induced by TNF $\alpha$ . NCS 613 treatment also slightly increased I $\kappa$ B $\alpha$  detection due to a lower degradation rate (24), which was correlated with lower inflammation in bronchi treated with the isoform-specific PDE4 inhibitor.



**Figure 4: Total cAMP-PDE and isoform specific hydrolytic activities in human bronchi and pulmonary arteries.** **A:** Total cAMP-PDE activity and relative contribution of PDE4 and PDE3 were assessed by radio-enzymatic measurement in human airway smooth muscle. **B:** Assessment of cytoplasmic cAMP-PDE PDE4 and PDE3 activities in human pulmonary artery. Data are expressed as pmol/min/mg protein and represent the mean  $\pm$  s.e.m. of 4 independent experiments.



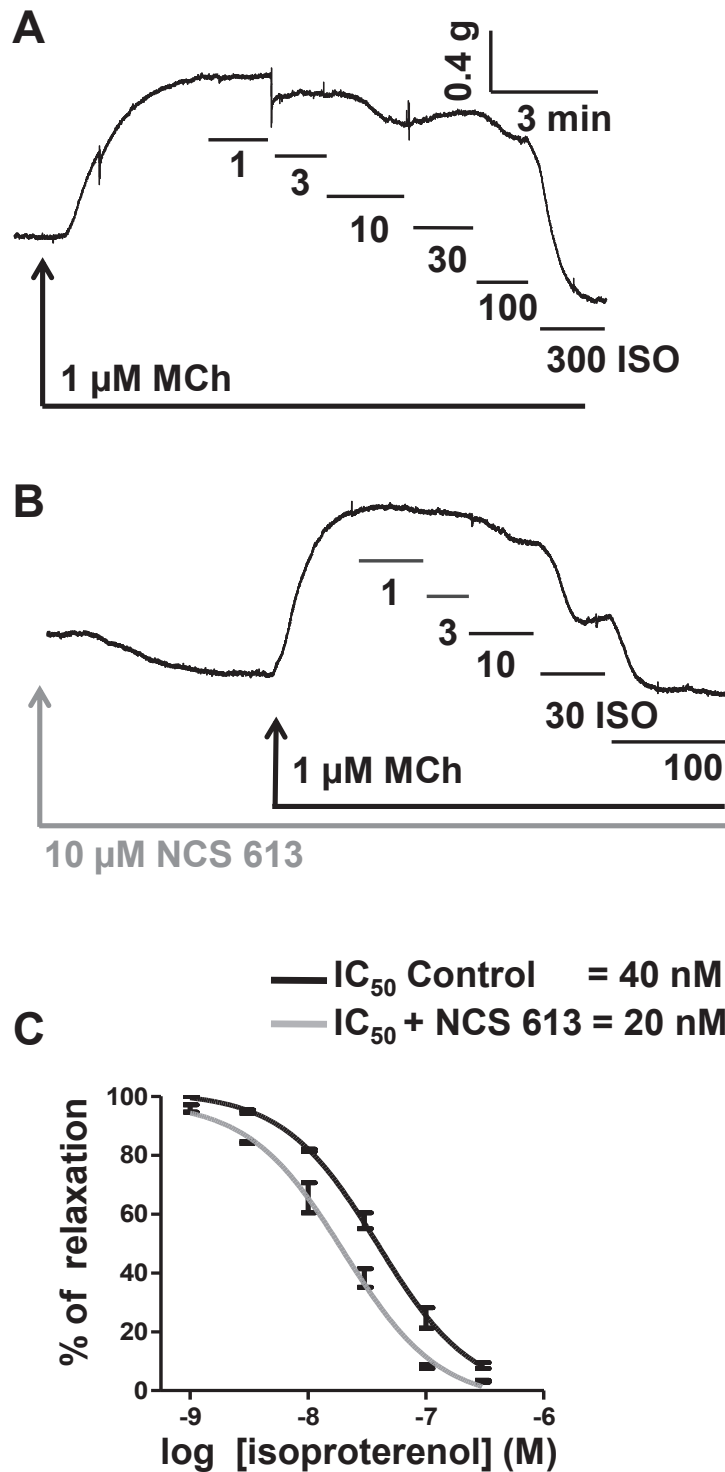
**Figure 5: Effect of 3  $\mu$ M NCS 613 treatment on pharmaco-mechanical responses of human pulmonary artery.** A-C: Representative superimposed recordings illustrating the tension induced by 80 mM KCl (A), 30 nM U-46619 (B) and 5 nM Endothelin (C) on cultured pulmonary arteries, in control conditions (dark trace) and in the presence of 10  $\mu$ M NCS 613 (grey trace). D: Bar histogram displaying the mean normalized contractile responses induced by 30 nM U-46619 and 5 nM Endothelin in control tissues and 3  $\mu$ M NCS 613-treated pulmonary arteries. NCS 613 treatment reduced pulmonary artery pharmaco-mechanical reactivity. Each column represents the mean  $\pm$  SEM, with n =14 for each experimental condition, \* p<0.05.



**Figure 6: Effects of NCS 613 on human bronchi hyperresponsiveness.**

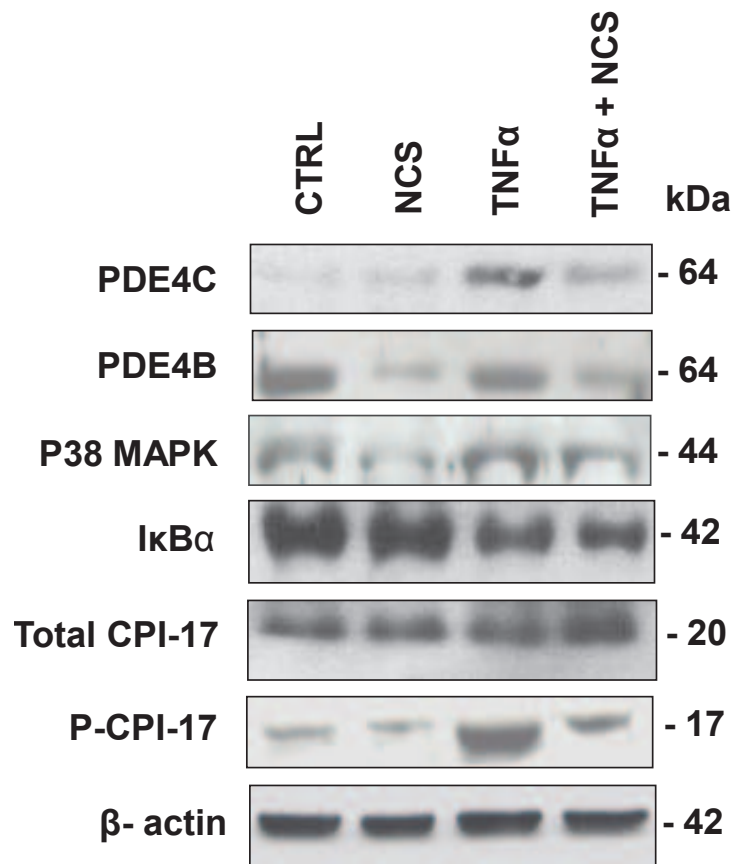
Human bronchi were treated for 48 h with 10 ng/ml TNF $\alpha$  in the absence (black lines) or presence of 10  $\mu$ M NCS 613 (grey lines; left panels). Representative superimposed recordings illustrating the tension induced by 1  $\mu$ M Methacholine (A), 1  $\mu$ M Histamine (B) and 30 nM U-46619 (C) on human distal bronchi. Right panels: Bar histogram displaying the mean contractile responses induced by 1  $\mu$ M Methacholine (D), 1  $\mu$ M Histamine (E) and 30 nM U-46619 (F). Responses to pharmacological agonists were normalized to the responses triggered by 80 mM KCl. Human bronchi were cultured for a 48 h period under the following experimental conditions: untreated (control), + 10  $\mu$ M NCS 613, + 10 ng/ml TNF $\alpha$  or 10 ng/ml TNF $\alpha$  + 10  $\mu$ M NCS 613. Each bar represents the mean  $\pm$  SEM, with n = 8 for each experimental condition, \* p < 0.05.





**Figure 7: Effects of NCS 613 on human bronchial relaxation induced by isoproterenol.**

**A:** Representative recording illustrating the tension induced by 1 μM MCh and subsequent relaxations in the presence of cumulative isoproterenol (ISO) concentrations in fresh human bronchi. **B:** Same experiment following acute pretreatment with 10 μM NCS 613. **C:** Mean relaxing responses to isoproterenol were assessed on human bronchi in the absence or presence of 10 μM NCS 613 pretreatments after which corresponding IC<sub>50</sub> values to isoproterenol were calculated (n = 12 for each data point).



**Figure 8: Effects of NCS 613 pre-treatments on various intracellular proteins and inflammation markers in human distal bronchi.** Relative detection of various intracellular proteins and inflammation markers were performed using specific antibodies against PDE4C, PDE4B, Phospho-p38 MAPK, I $\kappa$ B $\alpha$ , total CPI-17, phospho-CPI-17 and  $\beta$ -actin on cytosolic fractions derived from distal human bronchi in control conditions (CTRL) and upon 10  $\mu$ M NCS 613, 10 ng/ml TNF $\alpha$  and 10 ng/ml TNF $\alpha$  + 10  $\mu$ M NCS 613 treatments. All experiments were performed in bronchial explants cultured for a 48 h period under the exact same conditions. Results are representative of 3 independent experiments from three independent lung resections.

## Discussion

Chronic inflammation is a deleterious process occurring in several pulmonary diseases (39). Specific cAMP hydrolyzing phosphodiesterases (PDE4) have been shown to be involved in the control of inflammatory responses (9, 31, 36). In the present study, we report for the first time the characterization of cAMP-PDE activities as well as the location of four PDE4 subtypes (4A, 4B, 4C and 4D) in human lung parenchyma. We also demonstrate that a novel PDE4 inhibitor, NCS 613, is able to decrease inflammation markers in lung parenchyma by restoring I $\kappa$ B $\alpha$  detection, suggesting a potential buffering of NF $\kappa$ B signaling. This compound also reduced hyperresponsiveness in TNF $\alpha$ -treated bronchi, while potentiating isoproterenol induced-relaxation in human distal bronchi.

### 4.1 cAMP-PDE activities and PDE4 subcellular locations in human parenchyma.

While results showed that cAMP-PDE activities were present in all three subcellular compartments from human lung parenchyma, mean cytosolic cAMP-PDE activity was nevertheless higher than that measured in both microsomal and nuclear fractions. These data are consistent with those of a previous report showing that both cGMP and cAMP hydrolytic activities in bovine main pulmonary artery were higher in the cytosolic fraction comparatively to the microsomal fraction (26). PDE4 isozymes, which predominantly catabolize cAMP in the cell, clearly displayed differential distribution profiles in the present study. In human parenchyma, PDE2 and PDE4 were found to be the major cAMP hydrolyzing enzymes with mean contributions representing 40 % of total activity. Indeed, PDE4 activity which was relatively low in the nuclear fraction, may be important for inactivation of cAMP and its binding effectors, such as cAMP-dependent transcription factors. Previous studies have reported that PDE4 significantly contributes to cAMP hydrolysis in airways smooth muscle and lung epithelial cells (29). Moreover, microsomal fractions from bovine trachea have previously been shown to contain three PDE isoforms: PDE1, PDE3 and mainly PDE4, the latter representing 48 % of total cAMP hydrolytic activity (35).

In the present study, the distribution of PDE4 isoforms (PDE4A, 4B, 4C and 4D) also revealed differential distributions according to specific variants. As expected, these isoenzyme proteins were abundantly found in the cytosolic fraction, which is likely correlated with the presence of high cAMP hydrolytic activity. PDE4A (64 and 84 kDa) was only found in the cytosolic fraction, whereas PDE4B 64 kDa and PDE4D 83 kDa were differentially expressed in this compartment (15). As for the microsomal fraction, PDE4A 51 kDa and

mainly 3 PDE4C immuno-reactive bands (84, 75 and 64 kDa) were the predominant forms with PDE4C 75 kDa being exclusively expressed in this fraction. PDE4 activity was found to be lower in the nuclear fraction, although this compartment did reveal several PDE4 isoforms, with PDE4B 64 and 71 kDa being exclusively expressed in this fraction. Hence, according to their activity and subcellular location, PDE4 protein variants may participate in cAMP compartmentalization and henceforth regulate biological process, such as inflammation and airway smooth muscle tone. Indeed, it has been reported that PDE4D deficient mice are refractory to muscarinic cholinergic stimulation (22).

#### **4.2. NCS 613 abolishes inflammation in human lung parenchyma.**

The present data showed that treatment with the specific PDE4 inhibitor NCS 613 significantly decreased PDE4 activity in cultured parenchyma. More specifically, this treatment significantly decreased 75 kDa PDE4C detection, which is in agreement with the high selectivity of NCS 613 for the PDE4C subtype. In addition, the NF $\kappa$ B transcription factor repressor I $\kappa$ B $\alpha$  was consistently detected in native (fresh) parenchyma whereas cultured lung tissue in the absence of NCS 613 resulted in I $\kappa$ B $\alpha$  becoming undetectable, thus revealing a fast degradation rate which is likely correlated with the translocation of NF $\kappa$ B subunits into the nuclei (24). Interestingly, NCS 613 treatment restored I $\kappa$ B $\alpha$  detection in a concentration dependent manner, suggesting that I $\kappa$ B $\alpha$  binds to NF $\kappa$ B and prevents its nuclear translocation which would result in a lower inflammation status. In contrast, cytokine stimuli and oxidative stress can activate the NF $\kappa$ B pathway. Under these inflammatory conditions, I $\kappa$ B $\alpha$  is released from NF $\kappa$ B, ubiquitinated and degraded by proteasomes, thus decreasing its detection upon induced inflammation (12, 22). NF $\kappa$ B translocation thus allows gene transcription under its control and more specially those genes encoding for COX-1 and pro-inflammatory cytokines (*TNF* $\alpha$ , *IL-1*, *IL-6*).

Lung inflammation is the first leading cause of mucus secretion, airway hyperresponsiveness and fibrosis (19, 33). Increasing evidences have also revealed the implication of PDE4 in lung disease in regard to inflammation and remodeling (37). During the fibrotic process, PDE4 inhibitors display Epithelial Mesenchymal Transition (EMT), a critical event in this pathogenesis (14). Hence, the present data would suggest that NCS 613 may be a preventive agent for lung inflammation and injury.

#### **4.3. cAMP-PDE in human distal bronchi and pulmonary arteries.**

Patterns of cAMP-PDE activity were also assessed in human bronchi and pulmonary arteries. PDE4 and PDE3 hydrolytic activities were confirmed in these tissues, with PDE4 being the predominant cAMP hydrolyzing enzyme in bronchi (56 % of total cAMP-PDE). In pulmonary arteries, PDE4 and PDE3 hydrolyzed cAMP at similar rate, thus corroborating the results of a previous study whereby pulmonary artery smooth muscle cell (PASMC) PDE4 and PDE3 represented 35.9 % and 21.5 % of total cAMP hydrolytic activity respectively (19, 26). These results thus strongly suggest that PDE4 is a major cAMP hydrolyzing enzyme in lung smooth muscle and may represent a valuable pharmacological target through modulation of its functional properties.

#### **4.4. NCS 613 reduces mechanical tension induced by agonists in pulmonary artery**

Tension measurements conducted in the presence of either 80 mM KCl, 5nM endothelin or 30 nM U-46619 (a TP receptor agonist) showed that untreated pulmonary arteries exhibited higher mechanical responses than NCS 613-treated human pulmonary arteries. NCS 613-treated arteries also displayed delayed tonic response to TP and endothelin receptor activation. Such findings support the view that high hydrolytic activity maintains low levels of cAMP and may control pulmonary artery reactivity and/or media remodeling, two functional parameters related to pulmonary hypertension (9). PDE4 has also been shown to be implicated in hypertension by participating in artery remodeling. Indeed, pulmonary arterial hypertension (PAH) is described as a proliferative vascular disease, characterized by abnormal regulation of smooth muscle cell proliferation and higher tone in distal pulmonary arteries (10, 34). Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) analogues also display anti-proliferative effects on distal human PASMCs, which are dependent on intracellular cAMP stimulation (9). Furthermore, the effects of cAMP-stimulating agents have been reported to increase DNA synthesis, proliferation and MMP production, all of which are dependent, at least in part, on PDE4 activity (9). The authors of this latter study concluded that PDE4 inhibition may provide greater control of cAMP-mediated anti-proliferative effects in human PASMC and therefore could prove useful as an alternative therapy to PDE5 inhibitors in PAH. In the same manner, NCS 613 may also prevent pulmonary hypertension by selectively inhibiting PDE4 activity in pulmonary arteries.

#### **4.4. NCS 613 potentiates isoproterenol relaxation in human distal bronchi**

Relaxation induced by isoproterenol on human bronchi is mediated by  $\beta_2$  receptors, adenylyl cyclase and cAMP production. Herein, fresh human bronchi precontracted with 1  $\mu$ M MCh relaxed completely in response to cumulative concentrations of 1-300 nM isoproterenol. NCS 613 pretreatment, on the other hand, was shown to reduce basal tone. Moreover, when NCS 613-pretreated distal bronchi were contracted with 1  $\mu$ M MCh, only cumulative concentrations of 1-100 nM isoproterenol induced total relaxation. In addition, NCS 613 pretreatment decreased by 2 fold the  $IC_{50}$  value to isoproterenol. This observation could be explained by the fact that NCS 613 pretreatment likely lowers cAMP degradation rate, thus amplifying the effect of isoproterenol. Thus PDE4 isozymes are clearly involved in controlling airway smooth muscle tone as previously reported (35).

#### **4.5. NCS 613 prevents TNF $\alpha$ -induced human distal hyperresponsiveness**

Another facet investigated in the present study was the putative role of PDE4 in bronchial hyper-responsiveness occurring in lung diseases such as asthma and COPD. The well characterized pro-inflammatory cytokine TNF $\alpha$  was used to induce inflammation and hyper-responsiveness in an *in vitro* model of cultured human bronchi (24). In this particular model, TNF $\alpha$ -treated bronchi exhibit rapid and large mechanical responses induced by pharmacological agents such as MCh, Histamine and U-46619. In the present study, micromolar concentrations of NCS 613 exhibited preventive effects on airway responsiveness since it reduced mechanical responses to agonists in TNF $\alpha$ -treated bronchi, as witnessed by a shifting of the slope to the right, meaning a reduced sensitivity to agonists. Hence, NCS 613 significantly decreases hyper-responsiveness in TNF $\alpha$ -treated bronchi by controlling cAMP hydrolytic rate. Such inhibitory action of NCS 613 may represent a valuable tool in addressing cytokine-induced bronchial remodeling and hyper-responsiveness, which are well documented in asthma (7, 30). Under inflammatory conditions, cytokines such as TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  are known to induce up-regulation of various signaling pathways and proliferation of airway smooth muscle cells, hence resulting in an increased sensitivity to agonists (37, 38).

Finally, in order to better understand the role PDE4 inhibition on human bronchial hyper-responsiveness induced by TNF $\alpha$ , the putative pathways involved in this process were also analyzed by assessing the expression of PDE4C, PDE4B, phospho-CPI-17, I $\kappa$ B $\alpha$  and phospho-p38 MAPK. Indeed, TNF $\alpha$  is known to activate inflammatory signaling through involvement of p38 MAPK and NF $\kappa$ B (24) while CPI-17 is a phosphorylation-dependent inhibitor protein of myosin phosphatase and necessary for PKC-mediated Ca<sup>2+</sup> sensitization

(25). CPI-17 is believed to be implicated in bronchial hyper-responsiveness (25) in that inflammation and/or stress leads to up-regulation of its phosphorylated form (25). CPI-17 phosphorylation also results in an inhibition of MLCP activity, which in turn maintains steady state tension in ASM (25). Our data confirmed that TNF $\alpha$  did in fact induce an increase in phosphorylated CPI-17 protein in cultured human bronchi. Addition of NCS 613 resulted in a decrease in CPI-17 phosphorylation thus facilitating relaxation. Furthermore, TNF $\alpha$ -induced bronchial up-regulation of CPI-17 and hyper-responsiveness observed in our model was found to occur under inflammatory conditions since TNF $\alpha$  also increased PDE4B and PDE4C expressions and phospho-p38 MAPK while decreasing I $\kappa$ B $\alpha$  detection. In agreement with the functional data, NCS 613 treatment was found to reduce inflammation in TNF $\alpha$ -treated bronchi by decreasing both PDE4B and PDE4C detections and phosphorylated p38-MAPK expression. Concomitantly, NCS 613 was also found to increase I $\kappa$ B $\alpha$  expression, which is correlated with a low inflammatory status.

## **Conclusion**

The present study reports the presence of PDE4 activity and subcellular location of its isoforms in human lung parenchyma. While PDE4 remained the major cAMP hydrolyzing enzyme in cytosolic, microsomal and nuclear fractions, PDE4 isoform variants were differentially expressed according to the investigated subcellular compartment. These PDE4 isozymes likely control important biological responses in the lung since their inhibition by NCS 613 resulted in anti-inflammatory effects in parenchyma (37, 38). Furthermore NCS 613 demonstrated beneficial effects in airways reactivity to pharmacologically-induced airway smooth muscle contraction, hence providing further insight into its current status (33). This new PDE4 inhibitor was also found to reduce human distal bronchial hyperresponsiveness by decreasing phospho-CPI-17 which in turn may be related to a down-regulation of PDE4C, PDE4B, p38-MAPK and NF $\kappa$ B pathways. Thus, specific PDE4C inhibitors, such as NCS 613, may represent an alternative approach to reducing bronchial hyperresponsiveness.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

The authors thank Drs Marco Sirois and Chantal Sirois for their help in patient recruitment. The authors thank Dr Edmond Rizcallah and the members of the pathology laboratory for their technical support. This work was supported by transition grants from the FMSS and CRC E-LeBel. IY and CM are recipients of PhD-studentships from the European Doctorate College EDC (Strasbourg) and NSERC of Canada, respectively.



## References

1. Boichot E, Wallace JL, Germain N, Corbel M, Lugnier C, Lagente V, Bourguignon JJ. Anti-inflammatory activities of a new series of selective phosphodiesterase 4 inhibitors derived from 9-benzyladenine. *J Pharmacol Exp Ther* 292(2): 647-653, 2000.
2. Bourguignon JJ, Désaubry L, Raboisson P, Wermuth CG, Lugnier C. 9-Benzyladenines: potent and selective cAMP phosphodiesterase inhibitors. *J Med Chem.* 6, 40(12):1768-1770. 1997.
3. Brown, D. M., Hutchison, L., Donaldson, K., MacKenzie, S. J., Dick, C. A., Stone, V. The effect of oxidative stress on macrophages and lung epithelial cells: The role of phosphodiesterases 1 and 4. *Toxicology Letters*, 168 (1): 1-6, 2007.
4. Burgess, J. K., Oliver, B. G., Poniris, M. H., Ge, Q., Boustany, S., Cox, N., et al. A phosphodiesterase 4 inhibitor inhibits matrix protein deposition in airways in vitro. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 118 (3): 649-657, 2006.
5. Deng, Y. M., Xie, Q. M., Tang, H. F., Sun, J. G., Deng, J. F., Chen, J. Q., et al. Effects of ciclamilast, a new PDE 4 PDE4 inhibitor, on airway hyperresponsiveness, PDE4D expression and airway inflammation in a murine model of asthma. *European Journal of Pharmacology* 547 (1-3): 125-135, 2006.
6. Dent, G., White, S. R., Tenor, H., Bodtke, K., Schudt, C., Leff, A. R., et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase in human bronchial epithelial cells: Characterization of isoenzymes and functional effects of PDE inhibitors. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 11 (1): 47-56, 1998.
7. Dunkern, T. R., Feurstein, D., Rossi, G. A., Sabatini, F., Hatzelmann, A. Inhibition of TGF-beta induced lung fibroblast to myofibroblast conversion by phosphodiesterase inhibiting drugs and activators of soluble guanylyl cyclase. *European Journal of Pharmacology*, 572 (1): 12-22, 2007.
8. Fan Chung, K. Phosphodiesterase inhibitors in airways disease. *European Journal of Pharmacology* 533 (1-3): 110-117, 2006.
9. Growcott EJ, Spink KG, Ren X, Afzal S, Banner KH, Wharton J. Phosphodiesterase type 4 expression and anti-proliferative effects in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Respir Res.* 19: 7-9, 2006.
10. Guibert, C., Savineau, J. P., Crevel, H., Marthan, R., Rousseau, E. Effect of short-term organoid culture on the pharmaco-mechanical properties of rat extra- and intrapulmonary arteries. *British Journal of Pharmacology*, 146 (5): 692-701, 2005.

11. Houslay, M. D., Schafer, P., Zhang, K. Y. Keynote review: Phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discovery Today*, 10 (22): 1503-1519, 2005..
12. Jeon, K. I., Xu, X., Aizawa, T., Lim, J. H., Jono, H., Kwon, D. S., et al. Vinpocetine inhibits NF-kappaB-dependent inflammation via an IKK-dependent but PDE-independent mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (21): 9795-9800, 2010.
13. Keravis, T., Thaseldar-Roumie, R., Lugnier, C. Assessment of phosphodiesterase isozyme contribution in cell and tissue extracts. *Methods in Molecular Biology* 307: 63-74, 2005.
14. Kolosionek E, Savai R, Ghofrani HA, Weissmann N, Guenther A, Grimminger F, Seeger W, Banat GA, Schermuly RT, Pullamsetti SS. Mol Biol Cell. Expression and activity of phosphodiesterase isoforms during epithelial mesenchymal transition: the role of phosphodiesterase 4. 20 (22): 4751-4765, 2009.
15. Lopez, E., Jarreau, P. H., Zana, E., Franco-Montoya, M. L., Schmitz, T., Evain-Brion, D., et al. Differential expression of cyclic nucleotide phosphodiesterases 4 in developing rat lung. *Developmental Dynamics*, 239 (9): 2470-2478, 2010.
16. Lugnier, C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: A new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacology & Therapeutics*, 109(3): 366-398, 2006.
17. Lugnier, C., Keravis, T., Le Bec, A., Pauvert, O., Proteau, S., Rousseau, E. Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms associated to isolated cardiac nuclei. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1472(3): 431-446, 1999.
18. Lugnier, C., Muller, B., Le Bec, A., Beaudry, C., Rousseau, E. Characterization of indolidan- and rolipram-sensitive cyclic nucleotide phosphodiesterases in canine and human cardiac microsomal fractions. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 265(3): 1142-1151, 1993.
19. Murray F, Patel HH, Suda RY, Zhang S, Thistlethwaite PA, Yuan JX, Insel PA. Expression and activity of cAMP phosphodiesterase isoforms in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with pulmonary hypertension: role for PDE1 *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 292(1): L294-303, 2007.
20. Maclean MR, Johnston ED, Mcculloch KM, Pooley L, Houslay MD, Sweeney G. Phosphodiesterase isoforms in the pulmonary arterial circulation of the rat: changes in pulmonary hypertension. *J Pharmacol Exp Ther*. 283(2): 619-6124, 1997.

21. Martin-Chouly, C. A., Astier, A., Jacob, C., Pruniaux, M. P., Bertrand, C., Lagente, V. Modulation of matrix metalloproteinase production from human lung fibroblasts by type 4 phosphodiesterase inhibitors. *Life Sciences* 75(7): 823-840, 2004.
22. Méhats C, Jin SL, Wahlstrom J, Law E, Umetsu DT, Conti M. PDE4D plays a critical role in the control of airway smooth muscle contraction. *FASEB J.* 17(13): 1831-1841, 2003.
23. Morin, C., Proteau, S., Rousseau, E., Brayden, J. Organ-cultured airway explants: A new model of airway hyperresponsiveness. *Experimental Lung Research*, 31(7): 719-744, 2005.
24. Morin, C., Sirois, M., Echave, V., Gomes, M. M., Rousseau, E.. EET displays anti-inflammatory effects in TNF-alpha stimulated human bronchi: Putative role of CPI-17. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 38(2): 192-201, 2008.
25. Morin, C., Sirois, M., Echave, V., Rousseau, E. CPI-17 silencing-reduced responsiveness in control and TNF-alpha-treated human bronchi. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 39(6): 638-643, 2008.
26. Pauvert, O., Salvail, D., Rousseau, E., Lugnier, C., Marthan, R., Savineau, J. P. Characterisation of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in the media layer of the main pulmonary artery. *Biochemical Pharmacology*, 63(9): 1763-1772, 2002.
27. Rodriguez-Roisin, R. The airway pathophysiology of COPD: Implications for treatment. *COPD*, 2(2): 253-262, 2005.
28. Rousseau, E., Dostie, J., Taoudi-Benchekroun, M., Cadieux, A., Beaudry, C., Lugnier, C. Specific cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors differently modulate contractile kinetics in airway smooth muscle. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 73(12): 1784-1794, 1995.
29. Rousseau, E., Gagnon, J., Lugnier, C. Biochemical and pharmacological characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase in airway epithelium. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 140(2): 171-175, 1994.
30. Selige, J., Tenor, H., Hatzelmann, A., Dunkern, T. Cytokine-dependent balance of mitogenic effects in primary human lung fibroblasts related to cyclic AMP signaling and phosphodiesterase 4 inhibition. *Journal of Cellular Physiology* 223(2): 317-326, 2010.
31. Shi, J. R., Mao, L. G., Jiang, R. A., Qian, Y., Tang, H. F., Chen, J. Q. Monoammonium glycyrrhizinate inhibited the inflammation of LPS-induced acute lung injury in mice. *International Immunopharmacology*, 10(10): 1235-1241, 2010.
32. Singh, S. P., Mishra, N. C., Rir-Sima-Ah, J., Campen, M., Kurup, V., Razani-Boroujerdi, S., et al. Maternal exposure to secondhand cigarette smoke primes the lung for induction of

- phosphodiesterase-4D5 isozyme and exacerbated Th2 responses: Rolipram attenuates the airway hyperreactivity and muscarinic receptor expression but not lung inflammation and atopy. *Journal of Immunology*, 183(3): 2115-2121, 2009.
33. Spina, D. PDE4 inhibitors: Current status. *British Journal of Pharmacology*, 155(3): 308-315, 2008.
34. Tang, H. F., Chen, J. Q., Xie, Q. M., Zheng, X. Y., Zhu, Y. L., Adcock, I., et al. The role of PDE4 in pulmonary inflammation and goblet cell hyperplasia in allergic rats. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1762(5): 525-532, 2006.
35. Torphy, T. J., Udem, B. J., Cieslinski, L. B., Luttmann, M. A., Reeves, M. L., Hay, D. W. Identification, characterization and functional role of phosphodiesterase isozymes in human airway smooth muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. 265(3): 1213-1223, 1993.
36. Udalov, S., Dumitrascu, R., Pullamsetti, S. S., Al-tamari, H. M., Weissmann, N., Ghofrani, H. A., et al. Effects of phosphodiesterase 4 inhibition on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *BMC Pulmonary Medicine*. 10: 26, 2010.
37. Wang, Y. J., Jiang, Y. L., Tang, H. F., Zhao, C. Z., Chen, J. Q. Zl-n-91, a selective phosphodiesterase 4 inhibitor, suppresses inflammatory response in a COPD-like rat model. *International Immunopharmacology*, 10(2): 252-258, 2010..
38. Wollin, L., Bundschuh, D. S., Wohlsen, A., Marx, D., Beume, R. Inhibition of airway hyperresponsiveness and pulmonary inflammation by roflumilast and other PDE4 inhibitors. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 19(5): 343-352, 2006.
39. Yao, H., de Boer, W. I., Rahman, I. Targeting lung inflammation: Novel therapies for the treatment of COPD. *Current Respiratory Medicine Reviews*, 4(1): 57-68, 2008.

### III.5 Résultats complémentaires de manuscrit

Nous sommes intéressés à l'étude des cellules impliquées dans la tolérance immunitaire (rôle des lymphocytes) et dans l'inflammation (rôle des monocytes). La sous population leucocytaire concernée constitue les cellules mononuclées du sang périphériques, communément appelées « Peripheral Blood Monuclear Cells » (PBMCs). Les PBMC sont composées de lymphocytes et de macrophages. La population lymphocytaire se compose de cellules T (CD4+ et CD8+) environ ~75% et de cellules B combinées à des cellules NK environ ~25%. L'étude de cette sous population leucocytaire permet d'explorer l'inflammation et la réponse immunosuppressive dans le cas de maladie auto-immune comme le lupus. C'est ainsi que nous avons isolés et stimulé au LPS les PBMC de patients lupiques et sujets sains en culture pour provoquer une réaction de type inflammatoire, tout en mesurant l'effet du traitement par le NCS 613.

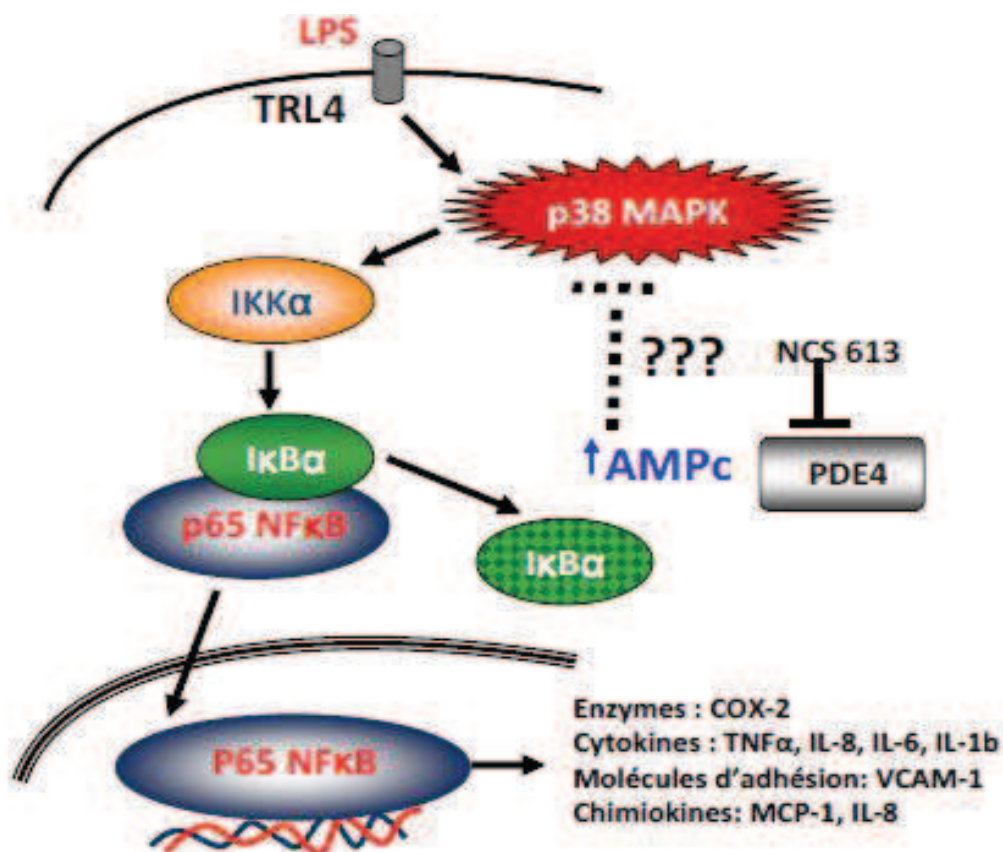
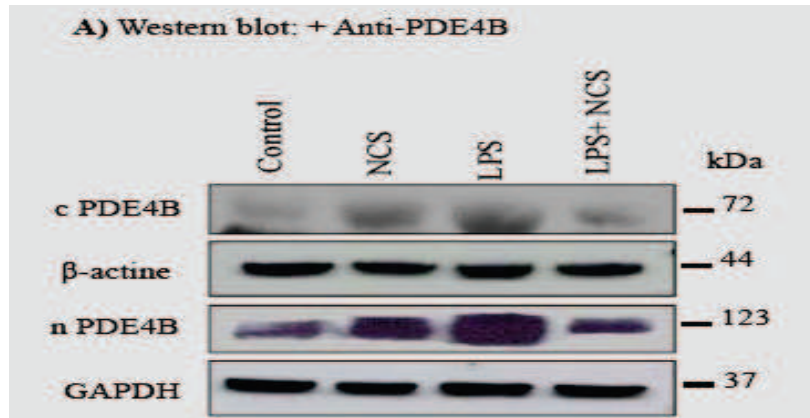


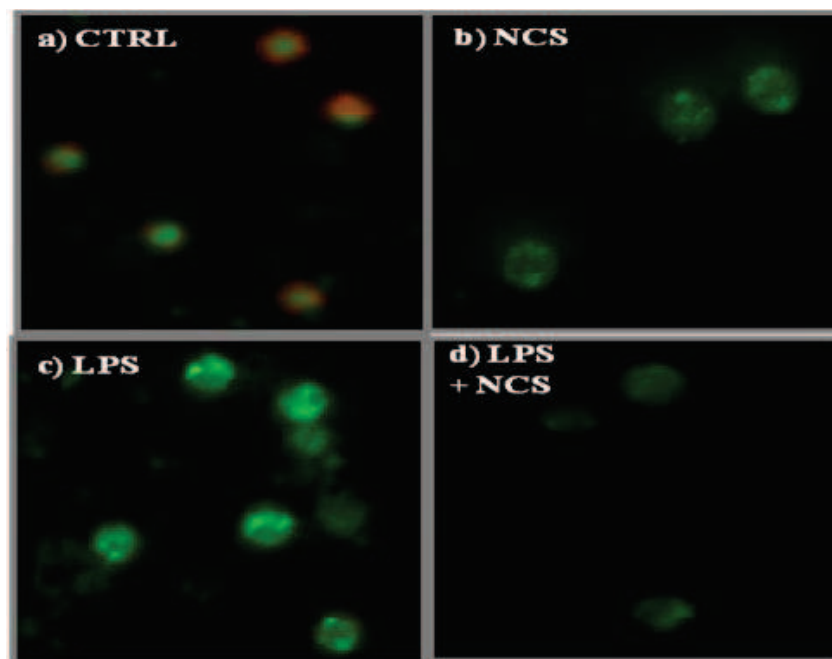
Figure 19. Objectifs du projet lupus humains et NCS 613. La voie de signalisation par la p38 MAPK qui est capable d'activer la translocation de NFκB pour induire une réaction inflammatoire. L'objectif de notre étude était d'analyser les conséquences de l'inhibition des PDE4s par le NCS 613 dans les PBMC en explorant la voie p38 MAPK et IκBα- NFκB. Nous avons aussi dosé dans les surnageants de culture les cytokines IL-6, IL-8 et TNFα.

### III.5.1 Effets anti-inflammatoires du NCS 613 sur les PBMC.

Les PBMC ont été stimulées en culture pendant 48h et traitées avec ou sans de NCS 613



### B) Immuno-cytochimie : Anti-PDE4B

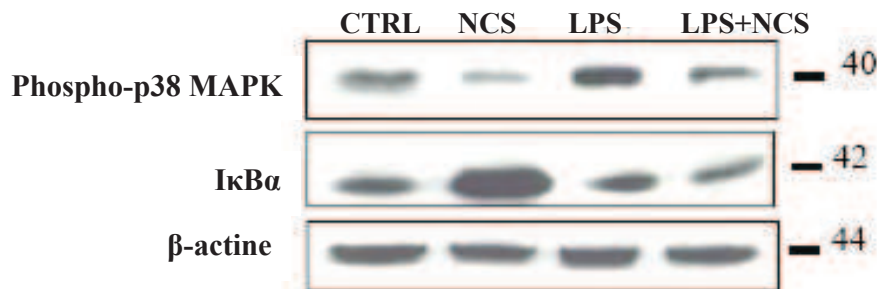


*Figure 20: Variation de l'expression de la PDE4B dans les PBMC de patients lupiques stimulées au LPS pendant 48h. A : les résultats de Western blot montrent que le traitement par le NCS 613 seule augmente l'expression de la PDE4B. Mais de façon plus marquée, la stimulation des PBMC par le LPS augmente l'expression de la PDE4B nucléaire et cytoplasmique. Le traitement au NCS613 permet de ramener à des niveaux contrôles l'expression de la PDE4B dans les PBMC stimulées au LPS. B : les résultats obtenus à partir de 3 expériences d'immunocytochimie confirment également que la stimulation des PBMC au LPS augmente l'expression de la PDE4B et que le traitement par le NCS 613 en présence de LPS tend à diminuer l'expression de la PDE4B. Sur ces images, le DAPI est en rouge, l'anticorps secondaire Alexa 488 reconnaissant l'anticorps primaire dirigé contre la PDE4B est en vert. La superposition des deux couleurs donne l'orange.*

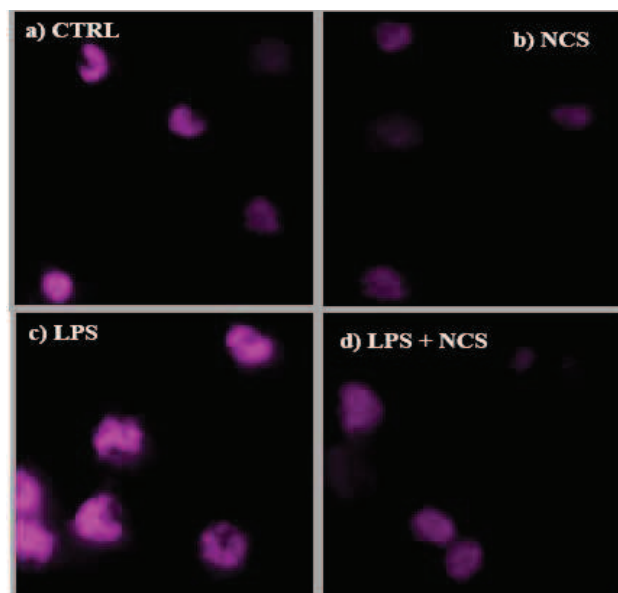


La voie de signalisation par la p38 MAPK est impliquée dans l'inflammation. La p38 MAPK est activée par le LPS et le TNF $\alpha$  qui augmente son niveau de phosphorylation. Cette kinase de stress phosphoryle I $\kappa$ B $\alpha$  et provoque la translocation de NF $\kappa$ B dans le noyau pour la transcription des cytokines qui sont sous son contrôle. Nous avons analysé alors par Western Blot et immuno-cytochimie l'activation de la p38 MAPK par le LPS et l'effet du traitement par le NCS 613 dans les PBMC de patient lupus et sujet sain.

**A) Analyse par immuno-buvadage de l'expression p38 MAPK et I $\kappa$ B $\alpha$ .**



**B) Immuno-cytochimie : anti-NF $\kappa$ B**



*Figure 21. Detections de la phospho-p38 MAPK et d'I $\kappa$ B $\alpha$  par Western Blot puis de la NF $\kappa$ B par immunocytochimie dans les PBMC humains stimulées ou non au LPS. **A** : le NCS 613 seul diminue le niveau de la phospho-p38 MAPK et augmente la détection de I $\kappa$ B $\alpha$ , ce qui est corrélé à une baisse de l'inflammation. La stimulation des PBMC par le LPS augmente le niveau de phosphorylation de la phospho-p38 MAPK et diminue la détection d'I $\kappa$ B $\alpha$  (le répresseur de NF $\kappa$ B) dans PBMC de patients lupiques ou de sujets sains. Le traitement des cellules stimulées au LPS par le NCS 613 ramène au niveau contrôle la phospho- p38 MAPK. **B** : le NCS 613 seul diminue la translocation de NF $\kappa$ B dans le noyau alors que la stimulation par le LPS augmente la translocation de NF $\kappa$ B dans le noyau. Le NCS 613 exerce son effet anti-inflammatoire en inhibant les voies de signalisations p38 MAPK et NF $\kappa$ B. Le DAPI est en bleu, l'anticorps secondaire Alexa 654 reconnaissant l'anticorps primaire dirigé contre la sous-unité p65 de NF $\kappa$ B en rouge et la superposition des deux couleurs donne le violet.*



### III.5.2 Effets antiprolifératifs du NCS 613 sur les cellules d'adénocarcinome A549

Pour tester l'effet antiprolifératif et anti-inflammatoire du NCS 613, nous avons utilisé une lignée cellulaire d'adénocarcinome (cellules A549). Dans un premier temps les cellules ont été cultivées en présence de différentes concentrations de NCS 613 ou sans et l'incorporation de thymidine tritiée pendant 24 h a permis de déterminer la concentration inhibant 50 % de croissance. Dans une seconde expérience, les cellules A549 ont été stimulées au TNF $\alpha$  et traitées ou non au NCS 613. Les cellules de lignée A549 ont été traitées par 5 et 10  $\mu$ M de NCS 613 et des explants adénocarcinomes pulmonaires humaines ont été cultivés en absence ou non de concentrations croissantes de NCS 613 (1, 3 et 10  $\mu$ M).

#### Expression de la PDE4C dans les cellules A549 au cours du traitement par le NCS 613

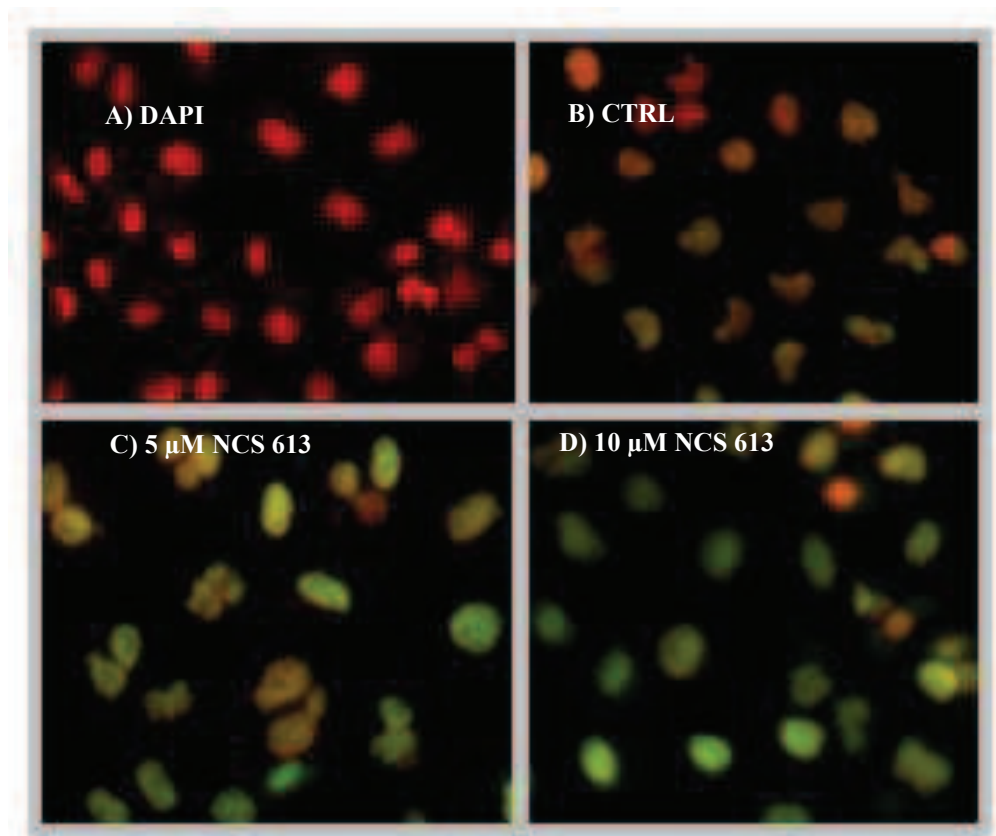


Figure 22: Expression de la PDE4C par immuno-cytochimie. **A:** Le DAPI est en rouge. L'anticorps secondaire Alexa 488 reconnaissant l'anticorps primaire dirigé contre la PDE4C en vert. La superposition des deux couleurs donnant l'orange. **B:** La PDE4C est détectée dans les cellules A549 en condition contrôle. **C et D:** Le traitement avec 5 et 10  $\mu$ M par le NCS 613 augmente de façon concentration dépendante l'expression de la PDE4C dans les cellules A549.

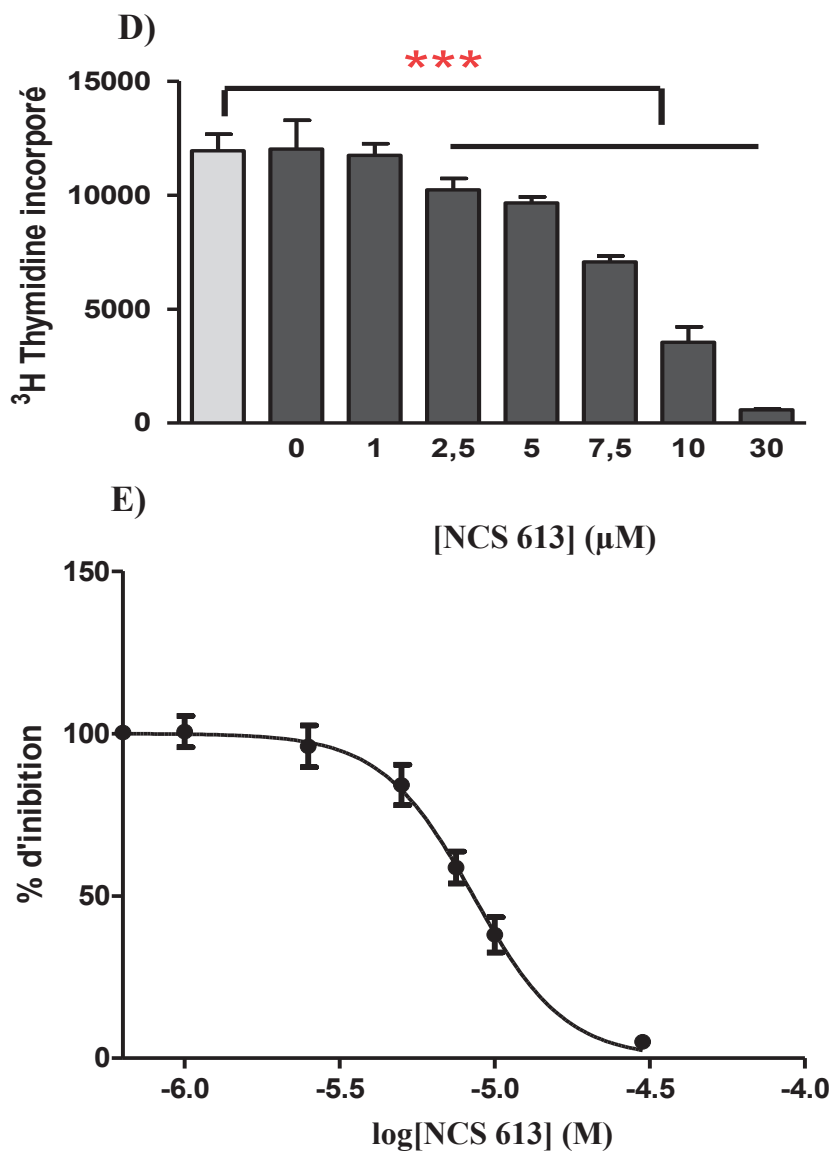
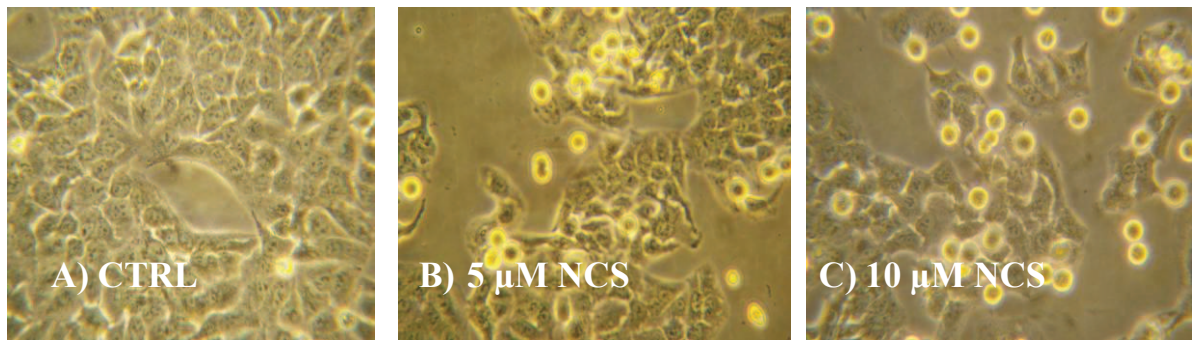
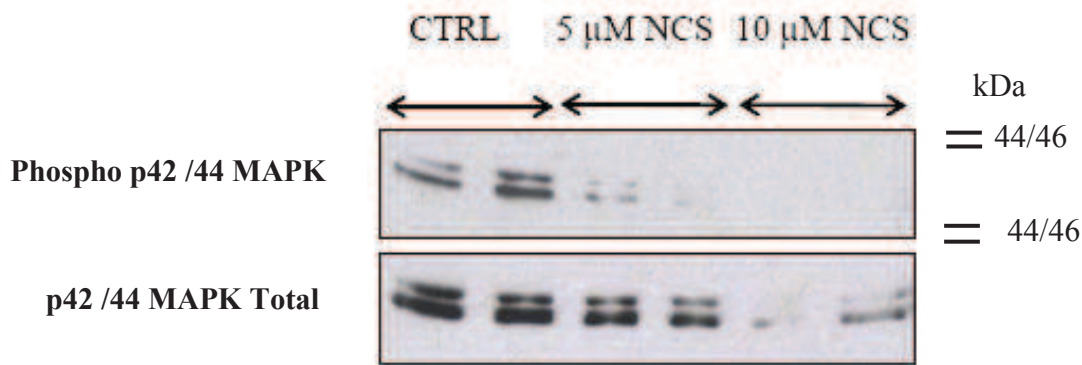


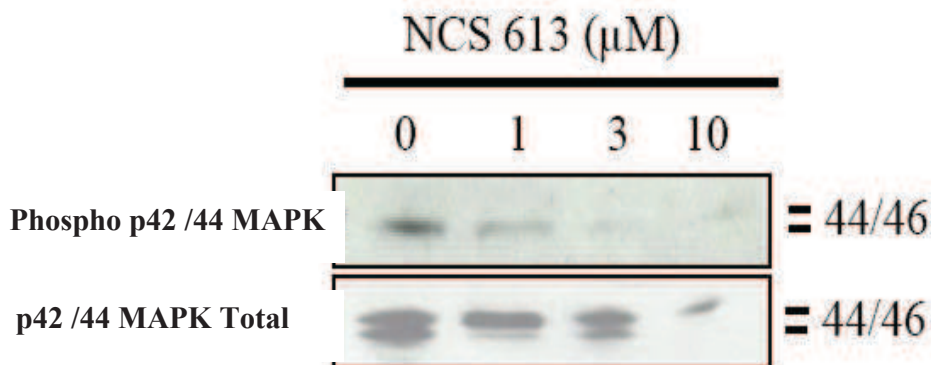
Figure 23: Effets antiprolifératifs du NCS 613 sur les cellules A549. **A** : les cellules de lignée d'adénocarcinome d'épithélium humain A549 prolifèrent en absence de NCS 613 et atteignent une forte confluence. **B** : le traitement par 5 et **C**) 10  $\mu\text{M}$  de NCS 613 diminue la croissance des cellules A549 et induit l'apoptose de nombreuses cellules. **D** : Le test de prolifération par incorporation de la thymidine tritiée montre que des concentrations de 2,5-30  $\mu\text{M}$  de NCS 613 diminuent significativement la prolifération des cellules A549. **E** : La courbe d'inhibition montre que le NCS 613

exerce un effet antiprolifératif concentration dépendante sur les cellules A549 avec une IC<sub>50</sub> de 8,52 μM.

**A) Western blot: anti-phospho-ERK1/2 et ERK total dans les cellules A549**



**B) Western blot : anti-phospho-ERK1/2 et ERK total dans les explants de carcinome pulmonaire humain**

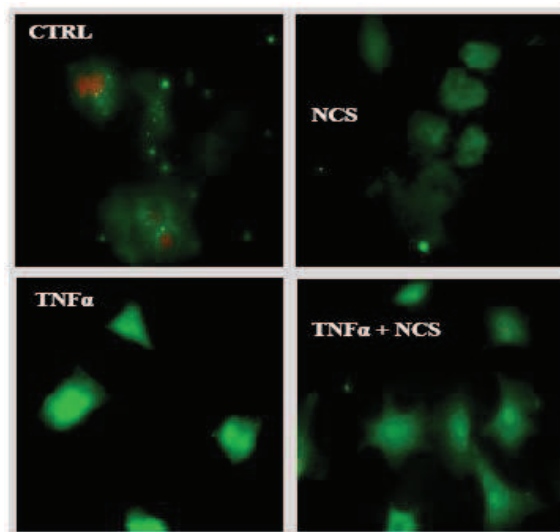


*Figure 24: Inhibition par le NCS 613 de la phosphorylation de ERK 1/2 et detection de ERK 1/2 total par Western blot. A : le traitement des cellules A549 par 5 et 10 μM de NCS 613 diminue de façon significative le niveau de phosphorylation de l'ERK 1/2. A la concentration de 10 μM, le NCS 613 diminue significativement l'expression de l'ERK total. B: Le NCS 613 diminue de façon concentration-dépendante l'expression de la phospho-ERK (A) dans les explants d'adénocarcinomes. De même, le traitement par 10 μM de NCS 613 réduit l'expression de la ERK total ce qui pourrait expliquer la diminution de la prolifération de ces cellules cancéreuses. Le NCS 613 exercerait donc son effet antiprolifératif sur les cellules A549 et les explants d'adénocarcinome en inhibant la phospho-ERK1/2.*

### III.5.3 Effets anti-inflammatoires du NCS 613 sur les cellules A549 et les explants d'adénocarcinome pulmonaire humaine.

Les cellules A549 ont été traitées stimulées au TNF $\alpha$  et traitées ou non au NCS613 pendant 48 h. Nous avons mesuré par immunocytochimie l'expression de la PDE4B et la translocation de NF $\kappa$ B dans le noyau.

#### A) Expression de la PDE4B dans les cellules A549 stimulées au TNF $\alpha$



#### B) Expression de NF $\kappa$ B nucléaire

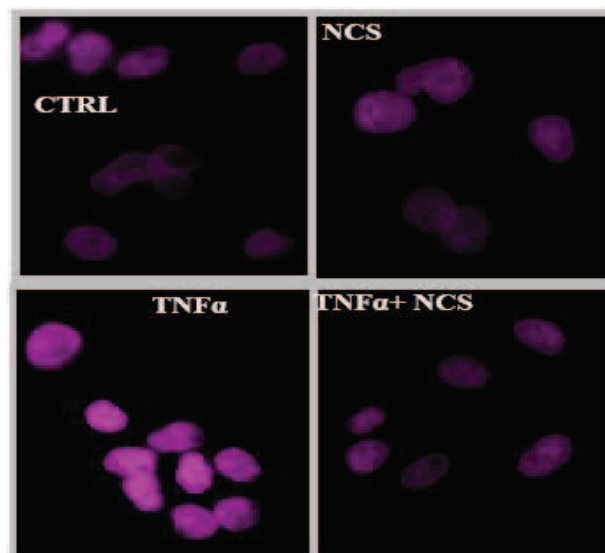


Figure 25: Expression de la PDE4B et inhibition de l'activation de NF $\kappa$ B dans les cellules A549 traitées au TNF $\alpha$ . **A** : La stimulation des cellules A549 au TNF $\alpha$  augmente de façon très importante l'expression de la PDE4B nucléaire ; qui diminue par le traitement avec 10  $\mu$ M de NCS 613. **B** : La stimulation des cellules A549 par le TNF $\alpha$  augmente la translocation de NF $\kappa$ B dans le noyau. Cet effet est aboli par le traitement au NCS 613. DAPI est en bleu,

l'anticorps secondaire Alexa 654 en rouge et Alexa 488 en vert. La superposition des couleurs donnent respectivement le violet (bleu et rouge) et l'orange (vert et rouge).

### Expression d'I $\kappa$ B $\alpha$ dans les explants d'adénocarcinomes pulmonaires humains traités au NCS 613.

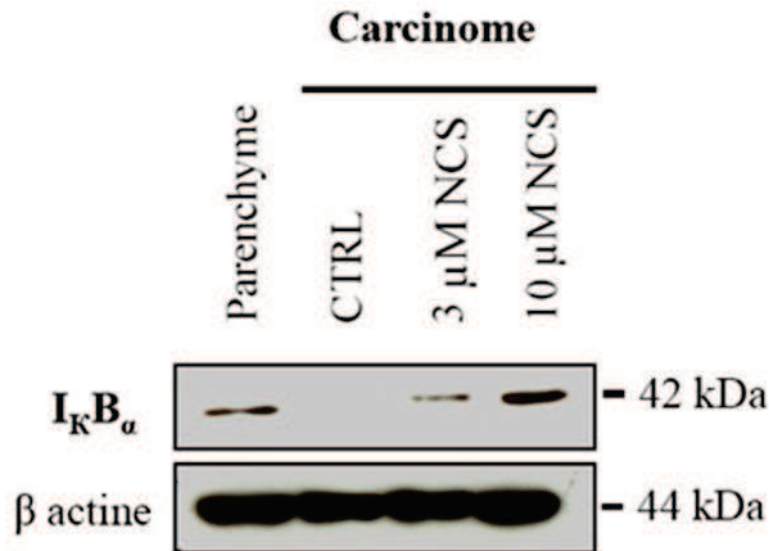


Figure 26: Détection d'I $\kappa$ B $\alpha$  dans les explants d'adénocarcinomes pulmonaires humains mis en culture organoïde. Dans le parenchyme natif pris pour contrôle on détecte I $\kappa$ B $\alpha$ . Lorsque les explants d'adénocarcinomes sont mis en culture on ne détecte plus I $\kappa$ B $\alpha$ . De façon intéressante le traitement de ces tissus avec 5 et 10  $\mu$ M NCS 613 rétablit de façon concentration dépendante la détection d'I $\kappa$ B $\alpha$  ; qui serait corrélé à une baisse de l'inflammation dans ces tissus.

### III. 5.4 Bilan des résultats complémentaires

Nos résultats complémentaires montrent que les PDE4 sont impliquées dans l'inflammation puisque la stimulation des PBMC par le LPS ou des cellules A549 augmente l'expression de la PDE4B et de la PDE4C. Le NCS 613 en inhibant les PDE4 exercerait des effets anti-inflammatoires dans les PBMC stimulées au LPS et dans les cellules A549 stimulées au LPS en inhibant la phosphorylation de la p38 MAPK et la translocation de NF $\kappa$ B dans le noyau. De plus le traitement au NCS 613 augmente la détection d'I $\kappa$ B $\alpha$  dans les explants d'adénocarcinome pulmonaire humaine et dans les PBMC, ce qui serait corrélé à une baisse de l'inflammation. De façon intéressante ces résultats montrent aussi que le NCS 613 a un effet antiprolifératif sur les cellules A549 avec une IC<sub>50</sub> de 8,5  $\mu$ M et qu'au niveau moléculaire il diminue la phosphorylation de la p42/44 MAPK dans les cellules A549 et les explants d'adénocarcinome.

## IV. DISCUSSION GENERALE

Mon projet de recherche doctoral m'a permis d'étudier le rôle des PDE4s dans l'inflammation chronique en utilisant 3 modèles différents modèles : i) *in vivo* chez la souris lupique MRL/lpr, ii) *ex vivo* dans les cellules mononuclées du sang périphérique chez des patients lupiques et des sujets sains et iii) *in vitro* dans les tissus pulmonaires, des explants et de cellules d'adénocarcinomes humaines (A549). Dans le rein de souris lupiques (siège d'une inflammatoire chronique causée par le dépôt d'auto-anticorps), nous avons montré que l'activité spécifiques PDE4 augmentait significativement au cours de la progression de la maladie. L'inhibition *in vivo* des PDE4s chez la souris lupique par le NCS 613 a montré des effets anti-inflammatoires aux niveaux systémique et tissulaire : une diminution de la sécrétion de TNF $\alpha$  et d'anticorps auto-immuns et l'augmentation du niveau d'AMPc dans le rein qui est fortement corrélée à une baisse de l'inflammation (Houslay et al., 2010). Cette baisse de l'inflammation due au NCS 613, permettait de prolonger la survie des souris lupiques traitées, tout en retardant l'apparition des auto-anticorps et de la protéinurie. La stimulation des PBMCs de patients lupiques augmente l'expression de la PDE4B, PDE4C des marqueurs de l'inflammation tels que la phospho-p38 MAPK et la translocation de NF $\kappa$ B dans le noyau. L'inhibition des PDE4 par le NCS 613 entraîne la diminution de la phosphorylation de p38 MAPK et la translocation de NF $\kappa$ B dans le noyau ; ce qui empêche la transcription des gènes pro-inflammatoires qui sont sous son contrôle. En plus de son effet anti-inflammatoire, le NCS 613 montre également un puissant effet antiprolifératif sur les cellules A549, en inhibant la phosphorylation de la p42/44 MAPK.

### IV.1 Implication des PDE4 dans l'inflammation chronique.

Mes travaux de recherche m'ont permis de montrer que l'augmentation de l'activité des PDE4 qui hydrolysent majoritairement l'AMPc dans le rein exposait les souris lupiques à une insuffisance rénale. Cette augmentation de l'activité hydrolytique de la PDE4 entraîne une baisse marquée de l'AMPc dans le rein des souris lupiques, ce qui induit des dommages architecturaux dans le rein, mais aussi une perturbation de la physiologie de la fonction urinaire. Les désordres liés à l'augmentation de l'activité des PDE4s dans le rein sont à deux niveaux : l'inflammation chronique du rein et la dysfonction rénale (mauvaise réabsorption). La baisse d'AMPc conduit à l'augmentation de l'inflammation dans le rein, ce qui est



confirmé du point de vue histologique par la forte présence de leucocytes au niveau du glomérule chez la souris lupique. Ces cellules présentes dans les glomérules sécrètent différents médiateurs chimiques pour éliminer les complexes immuns qui se déposent. Les complexes immuns activent le complément qui, à son tour favorise la destruction tissulaire. C'est le cas des macrophages qui sécrètent du TNF $\alpha$  pour éliminer les cellules rénales contenant des auto-anticorps. La perte de la fonction T régulatrice des cellules immunosuppressives dans le lupus (due à la baisse de la sécrétion de l'IL-2) ne permet pas de stopper le processus inflammatoire en cours (Mandler et al., 1982, Lieberman, Tsokos, 2010). Il s'installe alors un cercle vicieux entretenu par la présence des complexes immuns qui stimulent en permanence le système immunitaire. D'un autre point de vue, la baisse du niveau de l'AMPc dans le rein pourrait influencer la rétention sodique au niveau des tubules rénaux. La forte activité des PDE4s associée à la baisse de l'AMPc favorise la transduction du signal qui concourt à la sécrétion de nombreux médiateurs de l'inflammation : cytokine pro-inflammatoire, leucotriène, acide arachidonique...

Les changements d'activité de PDE4 sont associés à des modifications de l'expression des PDE4s dans le rein au cours de la mise en place du lupus. C'est le cas de la diminution de l'expression de certaines isoformes de la PDE4A, 4C et 4D rénales au cours du lupus chez la souris MRL/lpr. Seule l'expression de la PDE4B est augmentée au cours du lupus. Ces observations confortent notre hypothèse suggérant l'implication des PDE4 dans le contrôle du pool d'AMPc. En effet, la baisse du niveau d'AMPc entraîne par des mécanismes de feedback, une répression de l'expression des isoformes citées ci-dessus. Ce processus vise à diminuer l'activité hydrolytique de la PDE4 et d'augmenter le niveau d'AMPc trop bas à la normale. Nos résultats corroborent aussi celles d'études antérieures, ayant montré que la PDE4B est la seule isoforme impliquée dans la sécrétion de TNF $\alpha$  induite par le LPS dans les macrophages. (Jin et al., 2005). Nous avons observé que seule l'isoforme de la PDE4B augmentait au cours de la progression de la maladie, suggérant son rôle cruciale dans l'inflammation. Puisque que l'expression des isoformes de PDE4A, 4C et 4D diminuent, cela nous suggère que c'est la PDE4B qui serait en partie responsable de l'hydrolyse de l'AMPc et de l'amplification du processus inflammatoire. De façon intéressante, nous avons montré qu'un traitement par un inhibiteur de PDE4 permettait de prévenir les effets adverses observés au cours de cette maladie. Ceci est démontré par la capacité du NCS 613 à augmenter le niveau d'AMPc et à s'opposer à l'inflammation. Les souris lupiques traitées au NCS 613 sécrètent moins d'auto-anticorps et de TNF $\alpha$ , ce qui contribue également à prévenir



l'inflammation dans les tissus cibles. Dans le cas du rein, la baisse de la protéinurie témoigne de la réduction de l'inflammation dans cet organe ; ce qui contribue à l'amélioration du pronostic vital des animaux.

Dans les PBMCs de patients lupiques, nous avons montré que la stimulation au LPS (100 ng/mL) augmente l'expression cytoplasmique et nucléaire de la PDE4B. Cette augmentation de l'expression de la PDE4B a été déjà montrée comme responsable de la baisse de l'AMPc intracellulaire dans les macrophages (Jin, et al., 2005). Le LPS est un outil biochimique permettant d'induire le signal inflammatoire dans les leucocytes. Le LPS active par les Toll-like Receptor (TLR-4) et toute la cascade de signalisation permettant la production de TNF $\alpha$  (Guabiraba et al., 2010). Cette dernière passe par l'augmentation de l'activité des PDE4s et surtout l'expression de la PDE4B et de la PDE4C. L'induction de l'inflammation est corroborée par l'augmentation du niveau de la phosphorylation de p38 MAPK et aussi de la translocation de NF $\kappa$ B dans le noyau qui sont responsables de la transcription de gènes contrôlant la production de cytokine pro-inflammatoire (Uto et al., 2010). De façon intéressante l'inhibition des PDE4s avec 10  $\mu$ M de NCS 613 diminuait l'expression de la PDE4B, des marqueurs de l'inflammation comme la phospho-p38 MAPK et la translocation de NF $\kappa$ B. De plus, le traitement des PBMCs par 10  $\mu$ M de NCS 613 augmente l'expression d'I $\kappa$ B $\alpha$ .

La caractérisation de l'activité et de l'expression des PDE4 a permis de démontrer qu'il existe une forte activité des PDE4 dans le tissu pulmonaire suggérant fortement leurs implications dans des mécanismes physiologiques ou pathologiques dans le poumon. Dans l'inflammation pulmonaire induite au TNF $\alpha$ , nos résultats ont permis de montrer que l'inhibition des PDE4 dans le parenchyme pulmonaire humain prévenait la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$  de façon concentration-dépendante. De plus, l'induction de l'inflammation dans les bronches traitées par le TNF $\alpha$ , augmentait également l'expression de la PDE4B et la phospho-p38 MAPK. L'augmentation du statut inflammatoire dans les bronches traitées au TNF $\alpha$  a été confirmée par le fait que ces dernières devenaient hyperréactives. Le rôle des PDE4 dans l'inflammation a été bien étudié dans les cellules immuno-compétentes (Wang et al., 2010). Des études ont montré que les inhibiteurs de PDE4 entraînaient la suppression de nombreuses fonctions des cellules de l'inflammation: migration, libération de cytokines et production des espèces réactives de l'oxygène. Ces inhibiteurs empêchent la production de : l'histamine et de l'acide arachidonique par les polynucléaires basophiles, la sécrétion de TNF $\alpha$ , IL2, IL6 par

les lymphocytes, également la TNF $\alpha$ , IL-8, IL-12 par les macrophages et la libération de peroxyde, de leucotriène, d'IL-13 par les polynucléaires éosinophiles (Houslay et al., 2005, Lugnier, 2006). Par leurs activités hydrolytiques majoritaires, les PDE4 participent au contrôle du niveau d'AMPc intracellulaire et sa compartimentalisation ; ce qui désigne cette famille d'enzymes comme cible thérapeutique attractive pour traiter l'inflammation. Dans les différents modèles étudiés, que ce soit chez la souris lupique, sur les tissus pulmonaires humains ou au niveau cellulaire (PBMC, cellules A549), nos résultats suggèrent que l'induction de l'inflammation par les auto-anticorps, le LPS ou le TNF $\alpha$  passait par l'augmentation de l'expression des PDE4B. Ceci nous a conduit à étudier l'effet de l'inhibition des PDE4 dans le lupus et l'inflammation pulmonaire.

## **IV.2. Effets biologiques du traitement par le NCS 613:**

Le NCS 613 est un inhibiteur spécifique de PDE4 qui inhibe la production de TNF $\alpha$  et d'acide arachidonique (Boichot et al., 2000). Il exerce ces effets anti-inflammatoires à plusieurs niveaux : soit directement sur les cellules sanguines de l'inflammation soit *in situ* dans les tissus en inflammation.

### **IV.2.1 Effets biologiques du NCS 613 au niveau systémique dans les cellules sanguines.**

Les maladies auto-immunes sont définies par la perte de la tolérance physiologique aux composantes du soi. Le soi est reconnu comme étranger par le système immunitaire et plus particulièrement par les lymphocytes T considérés comme auto-réactifs. Dans ces maladies auto-immunes, les lymphocytes B auto-réactifs sont au cœur de la pathologie, ces dernières sécrétant en grande quantité les auto-anticorps. Au cours du lupus, des altérations de voies de signalisations conduisent à des dérégulations des lymphocytes T, chefs d'orchestre de l'immunité. Ces lymphocytes T sont activés par un faible seuil d'excitation provoquant une entrée de calcium et la phosphorylation des protéines impliquées dans la voie de transduction du signal TCR-CD3 (Toubi, 2008, Crispin et al., 2010). Ces lymphocytes hyper-activés stimulent les cellules B auto-réactives à produire des auto-anticorps et les macrophages à sécréter du TNF $\alpha$ . Dès lors, le blocage de la sécrétion d'auto-anticorps et de TNF $\alpha$  devient une stratégie thérapeutique intéressante pour contrôler la progression du lupus. Nous avons montré que l'administration du NCS 613 (30  $\mu$ g/100 $\mu$ l PBS) réduisait la sécrétion des auto-anticorps dans le sérum des souris lupiques traitées, de même que le dépôt des complexes

immuns dans le rein, la rate, le cœur, et le foie. Ces observations pourraient s'expliquer par l'effet immunosuppresseur du NCS 613 sur les cellules T et B, comme il a été déjà montré dans la littérature avec le rolipram (Bopp et al., 2009). De façon intéressante le NCS 613 diminue aussi la sécrétion de TNF $\alpha$  (44 %) chez la souris MRL/lpr traitée. L'inhibition de la sécrétion de TNF $\alpha$  par le NCS 613 contribue fortement à l'amélioration du bien-être et la survie des souris traitées. Les nouvelles stratégies de prise en charge du lupus ciblent le TNF $\alpha$  avec l'anticorps anti-TNF $\alpha$  (Segal, et al., 2001) ou encore l'inhibition de l'activité des lymphocytes B et la sécrétion des auto-anticorps par l'administration d'anticorps monoclonaux contre le CD20 comme le rituximab (Devauchelle-Pensec et al., 2008; Pers et al., 2008). Les anticorps anti-TNF $\alpha$  se lient au TNF $\alpha$ , le neutralisent et l'empêchent d'agir. L'un des premiers anti-TNF $\alpha$  qui est l'Infliximab est utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, de la maladie de Crohn sévère et de la spondylarthrite ankylosante. Le rituximab est un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre la molécule de surface CD20 (présente sur la plupart des cellules B). Il permet de diminuer de façon substantielle le nombre de lymphocytes B par un effet toxique direct sur ces cellules (Reff et al., 1994). L'inhibition de voies impliquées dans l'inflammation (p38 MAPK), dans les PBMCs de patients lupiques vient confirmer les observations déjà obtenues chez la souris MRL/lpr au niveau systémique. Le traitement par le NCS 613 agit donc comme un traitement mixte anti-TNF $\alpha$  + anti-CD20. Cette double action du NCS 613 se traduit par le retardement de la sécrétion d'autoanticorps, de TNF $\alpha$  et de la protéinurie chez les souris lupiques traitées.

#### **IV.2.2 Effets biologiques du NCS 613 au niveau tissulaire**

Nous avons montré à ce titre que le NCS 613 diminuait de façon significative le dépôt de complexes immuns dans les organes cibles comme: le rein, la rate, le cœur et le foie. Les coupes histologiques de rein ont permis de montrer que les souris lupiques non traitées avaient une forte infiltration de lymphocytes au niveau des glomérules pouvant provoquer par une destruction de ces dernières par l'inflammation qu'ils induisent. Par ailleurs, les souris traitées avaient des atteintes histologiques moins avancées ; c'est-à-dire que leurs glomérules étaient moins détruits. Il aurait fallu étudier l'expression de marqueurs d'inflammation comme I $\kappa$ B $\alpha$ , NF $\kappa$ B, p38 MAPK, ou la monocyte protein chemottractant 1 (MPC-1) dans le rein pour confirmer les effets anti-inflammatoires du NCS 613 au niveau moléculaire.

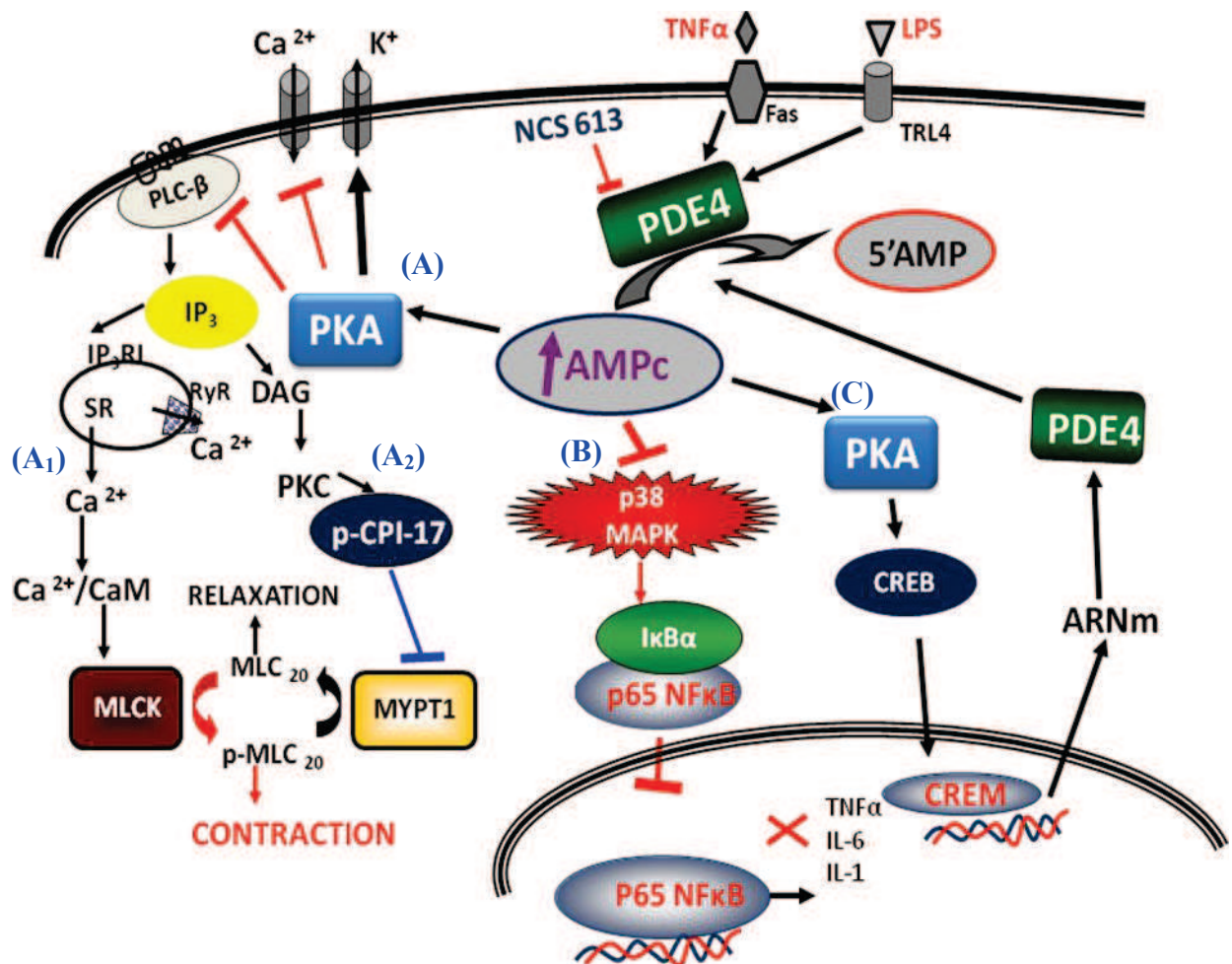


Figure 27. Les effets biologiques du NCS 613 sur différentes cibles moléculaires dans différents tissus et cellules. **A** : L'augmentation de l'AMPc suite à l'inhibition des PDE4 par le NCS 613 active la PKA qui favorise la déphosphorylation de la p-MLC et permet la relaxation. Dans un traitement aigu des bronchioles humaines par le NCS 613, l'augmentation l'AMPc intracellulaire active la PKA qui inhibe la PLC- $\beta$  et la mobilisation du Ca<sup>2+</sup> (A<sub>1</sub>). La diminution du [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> favorise la relaxation des muscles lisses des voies respiratoires, ce qui explique en partie l'effet potentialisant du NCS 613 en présence d'isoprénaline. Dans un traitement chronique des bronchioles humaines rendues hyperréactives par le TNF $\alpha$ , le NCS 613 diminue le niveau de phosphorylation de la CPI-17 et reverse ainsi l'hyperréactivité bronchique (A<sub>2</sub>). **B** : Le NCS 613 exerce son effet anti-inflammatoire au niveau cellulaire et tissulaire en inhibant la voie de signalisation de la p38 MAPK et de I $\kappa$ B $\alpha$ - NF $\kappa$ B. **C** : L'inhibition chronique des PDE4s par le NCS 613 entraîne la phosphorylation de CREB par la PKA et par cascade d'activation des facteurs de transcription la synthèse *de novo* des PDE4 dans le but d'augmenter leurs activités et diminuer le taux d'AMPc trop élevé.

Dans l'inflammation pulmonaire, nos travaux suggèrent que le NCS 613 exerce un effet anti-inflammatoire en augmentant le niveau de détection d'I $\kappa$ B $\alpha$ . Dans le parenchyme natif, nous détectons I $\kappa$ B $\alpha$  qui est utilisé comme marqueur d'inflammation tissulaire. La mise en culture pendant 48h du tissu provoque un processus inflammatoire. Ceci se traduit par l'absence

totale d'I $\kappa$ B $\alpha$  dans les tissus contrôles. Dans les tissus mis en culture et traités par 10  $\mu$ M de NCS 613, la détection d'I $\kappa$ B $\alpha$  prouve que ce dernier bloque le processus inflammatoire. Egalement, dans les bronchioles humaines mise en culture, la présence du TNF $\alpha$  augmentait l'expression des markers de l'inflammation comme la phospho-p38 MAPK. L'inflammation rend ces bronchioles humaines hyperréactives en présence de différents agonistes, ce qui était abolit par le traitement au NCS 613.

Il est bien connu que l'inflammation est une composante essentielle dans le développement du cancer (Balkwill and Mantovani, 2010). Dans les explants d'adénocarcinome mis en culture, I $\kappa$ B $\alpha$  est indétectable. Son niveau de détection revient de façon concentration dépendante avec le traitement par le NCS 613. Ce phénomène est similaire à celui observé dans le parenchyme et suggère que la simple mise en culture de ces tissus peut provoquer leur entrée en processus inflammatoire. Nous avons confirmé dans un modèle cellulaire d'adénocarcinome humain (A549) que la stimulation au TNF $\alpha$  provoquait la mise en place d'un processus inflammatoire, qui est aboli par le traitement au NCS 613.

#### **IV.3 Régulation des PDE4 suite à l'inhibition chronique par le NCS 613**

Le mécanisme de régulation de l'activité enzymatique des PDE4 est assez complexe puisqu'elle dépend du niveau d'AMPc intracellulaire, mais aussi de l'effet d'autres effecteurs comme la PKA et les ERK (Berman et al., 2005, Houslay, 2010 ). L'AMPc est synthétisée par l'adénylate cyclase et hydrolysée par les PDEs. Le taux d'AMPc dans la cellule est régulée par l'activité hydrolytique des PDEs (majoritairement de la PDE4) qui est plus forte que l'activité de synthèse (Adderley et al., 2010). Dans le modèle in vivo, chez la souris lupique, l'augmentation de l'activité de la PDE4 rénale entraînait une baisse du niveau de l'AMPc et de l'expression de 3 isoformes (PDE4A, 4C et 4D). Cette diminution de l'expression des isoformes de PDE4 diminue l'activité hydrolytique de cet enzyme vis-à-vis de son substrat, en vue de la rétablir à des valeurs physiologiques. Après un traitement chronique au NCS 613, nous avons également observé une augmentation de l'activité des PDE4 chez les animaux traités (saines ou lupiques) et cette fois-ci associée à un niveau d'AMPc élevée. Cette augmentation de l'activité des PDE4 en réponse au traitement au NCS 613 est bien différente de la première ; puisque l'inhibition des PDE4 favorise l'augmentation du niveau d'AMPc dans le rein. En présence d'un taux d'AMPc élevé, il y a également une augmentation de l'expression des différents isoformes de PDE4. Ces résultats nous suggèrent d'une part que l'augmentation de l'activité des PDE4 associée à une diminution de l'AMPc



entraîne une répression de l'expression de ces isoformes de PDE4. D'autre part, l'augmentation de l'activité PDE4 associée à un niveau d'AMPc élevé favorisait l'induction des nouvelles isoformes de PDE4. Dans les deux cas de Figures, il s'agit d'une régulation à long terme visant à ramener le taux d'AMPc au niveau basal par la modulation de l'activité hydrolytique des PDE4. Nous avons également observé dans les modèles cellulaires que l'inhibition des PDE4 par le NCS 613 entraînait toujours une augmentation de l'expression des isoformes de PDE4B et 4C. Ceci allant toujours dans le même sens de baisser le niveau d'AMPc élevé. Des travaux antérieurs avaient aussi montré que l'inhibition des PDE4 dans les cellules HUVEC par le rolipram (8h), entraînait l'augmentation de l'activité des PDE4 et l'induction d'une isoforme de la PDE4D (Campos-Toimil et al., 2008). Quand le niveau d'AMPc augmente dans la cellule, la PKA phosphoryle les isoformes longues de PDE4 pour augmenter leur  $V_{max}$  et provoquer une chute du niveau d'AMPc intracellulaire (Moorthy et al., 2010).

#### **IV.4. Voies de signalisations potentiellement régulées par NCS 613**

L'implication des PDE4B dans l'inflammation a été démontrée dans les macrophages de lavages broncho-alvéolaires de souris Knock-Out pour le gène de la PDE4B. Ces macrophages produisent moins de TNF $\alpha$  lorsqu'elles sont stimulées au LPS (Jin et al 2005 ). La sécrétion de TNF $\alpha$  passe par l'augmentation de l'expression de la PDE4B et la baisse de l'AMPc intracellulaire. De plus, les agents pharmacologiques augmentant le niveau de l'AMPc intracellulaire comme la forskoline (activateur de l'adénylate-cyclase) et le rolipram entraînent la diminution de la sécrétion de TNF $\alpha$ .

L'effet anti-inflammatoire du NCS 613 est médié par l'inhibition de la PDE4B, de la phospho-p38 MAPK et celle de NF $\kappa$ B qui font partie des voies de signalisations impliquées dans l'inflammation. La kinase de stress p38 MAP kinase est activée par divers stimuli incluant le choc osmotique, les cytokines inflammatoires, le lipopolysaccharides (LPS), les rayons ultraviolets et les facteurs de croissance (Li et al., 2010). Ils sont donc impliqués dans l'inflammation, la régulation de la fonction immunitaire, la survie et la prolifération cellulaire. La stimulation des PBMC par le LPS augmente l'expression de la PDE4B et le niveau de phosphorylation de la p38 MAPK. Cette phosphorylation de la p38 MAPK entraîne l'activation de NF $\kappa$ B qui migre dans le noyau. Dans les conditions normales, I $\kappa$ B $\alpha$ , le répresseur du facteur de transcription NF $\kappa$ B se lie à ce dernier et empêche sa translocation dans le noyau. L'activation des récepteurs de la famille du TNF favorise la phosphorylation

d'IKK et la dissociation du complexe I $\kappa$ B $\alpha$ - NF $\kappa$ B. I $\kappa$ B $\alpha$  est ubiquitiné et dégradé dans les protéasomes, sa détection dans la cellule diminue alors dans l'inflammation. NF $\kappa$ B est transloqué dans le noyau et permet la transcription des gènes qui sont sous son contrôle (Kamata et al., 2010). L'augmentation du niveau de détection d'I $\kappa$ B $\alpha$  est fortement corrélée avec la baisse de l'inflammation dans un tissu donné. Par des techniques de Western blot, nous avons montré que le traitement des PBMC avec 10  $\mu$ M de NCS 613 inhibe la phosphorylation de la p38 MAPK en présence de LPS. De plus, le NCS 613 tout seul augmente le niveau de détection d'I $\kappa$ B $\alpha$ . Ces observations sont corroborées par les résultats obtenus par immuno-histochimie montrant que le NCS 613 empêchait la translocation de NF $\kappa$ B dans le noyau des PBMC stimulées au LPS et les cellules A549 stimulées par le TNF $\alpha$ . En somme, l'inhibition des PDE4 bloque la transduction du signal par la voie p38 MAPK. NF $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  et p38 MAPK sont souvent utilisés comme marqueurs d'inflammation pour étudier l'effet anti-inflammatoire d'un composé pharmacologique. Cette étude nous a permis d'élucider au niveau moléculaire et cellulaire, les effets anti-inflammatoires potentiels du nouvel inhibiteur de PDE4, le NCS 613.

Une autre voie de signalisation potentiellement modulée par le NCS 613 concerne celle des p42/44 MAPK ou ERK1/2 qui est impliquée dans la prolifération cellulaire (Klinger et al.). Nos résultats suggèrent que le NCS 613 en inhibant la phosphorylation d'ERK1/2 dans les cellules A549 pouvait diminuer leur prolifération. Pour leur croissance, les cellules ont besoin d'incorporer la thymidine qui est une base azotée nécessaire à la synthèse de l'ADN. Plus les cellules prolifèrent, plus elles incorporent la thymidine. Un test de prolifération avec incorporation de thymidine tritié a permis de démontrer de façon pertinente cet effet antiprolifératif du NCS 613. Ce composé inhibe la croissance des cellules A549 avec une IC<sub>50</sub> de 8,5  $\mu$ M. Dans les cellules de lignées A549 ou dans les explants d'adénocarcinome humain, le NCS 613 pourrait bloquer la prolifération et à un certain degré l'inflammation.



## V. CONCLUSION

Nos travaux ont permis de montrer que les PDE4 qui hydrolysent majoritairement l'AMPc, jouent un rôle crucial dans deux modèles d'inflammation chronique. Dans le modèle murin du lupus, l'activité PDE4 rénale augmente au cours du lupus et est associée à des altérations d'expressions de certains isoformes de PDE4 (4A, 4B et 4C). Dans les modèles tissulaires (parenchyme pulmonaire et bronches) et cellulaires (PBMC et cellules A549) l'induction de l'inflammation par divers stimuli (TNF $\alpha$ , LPS) augmentait l'expression de la PDE4B. De façon pertinente, nous avons aussi montré qu'un traitement par un inhibiteur spécifique de PDE4, le NCS 613 serait une stratégie thérapeutique pour contrôler cette inflammation.

Ainsi un traitement chronique de 6 semaines au NCS 613 prolongeait la survie des souris lupiques (MRL/lpr) en diminuant la sécrétion des auto-anticorps sériques et le dépôt de leurs complexes immuns dans les tissus cibles (rein, rate, cœur et foie). Ce traitement augmentait également le niveau d'AMPc dans le rein (exerce un effet anti-inflammatoire), et améliorait aussi la fonction rénale chez les souris traitées. Ces améliorations se traduisaient par le retard d'apparition de la protéinurie qui est un marqueur de la dysfonction rénale. Les effets bénéfiques de ce traitement chez la souris MRL/lpr sont démontrés par la réversion des modifications d'expressions des PDE4. Du point de vue moléculaire et cellulaire, le NCS 613 exerce son effet anti-inflammatoire en inhibant la phosphorylation de la p38 MAPK et aussi la translocation de NF $\kappa$ B dans le noyau des cellules de l'inflammation.

Au niveau pulmonaire, nos travaux ont permis de caractériser pour la première fois l'activité et l'expression relatives des isoformes de PDE4 (cible thérapeutique potentielle de l'inflammation) dans le parenchyme pulmonaire humain. Le traitement *in vitro* par le NCS 613 a montré également un effet anti-inflammatoire net sur le parenchyme pulmonaire par la protection de la dégradation d'I $\kappa$ B $\alpha$ . Ce composé prévient l'hyperréactivité bronchique induite *in vitro* par un traitement au TNF $\alpha$ . De plus le NCS 613 a montré des effets antiprolifératifs sur des cellules A549 et sur des explants d'adénocarcinome pulmonaire humain en inhibant l'expression de la phospho-ERK1/2. En somme, le NCS 613 exerce son effet anti-inflammatoire au niveau systémique, tissulaire et subcellulaire. Son utilisation serait potentiellement bénéfique pour le traitement du lupus et de l'asthme.

## VI. PERSPECTIVES

Nous avons réalisés plusieurs types d'expériences qui ont permis d'élucider les bases moléculaires et cellulaires des effets anti-inflammatoires du NCS 613 dans des modèles *in vivo* chez la souris lupiques, *in vitro* dans les tissus pulmonaires mises en culture, et *ex vivo* dans les PBMC de patients lupiques. L'ensemble de ces résultats précliniques démontrent de façon non équivoque l'intérêt de développer le NCS613 comme une nouvelle classe d'anti-inflammatoire potentiel dans le traitement de diverses pathologies évoluant vers des formes d'inflammation chronique.

Dans le lupus érythémateux disséminé, chez la souris et dans les cellules mononuclées du sang périphérique de patients lupiques, nous avons montré que le NCS 613 pouvait prévenir la progression de cette maladie par ses effets anti-inflammatoires et immunosuppressives. Au regard de ces résultats et de ceux ayant démontré des effets non-toxiques du NCS 613 chez les animaux ; il serait intéressant d'entreprendre des études cliniques en administrant ce produit à un petit groupe de patient lupique. Une administration de ce composé à des patients lupiques permettrait de confirmer l'intérêt thérapeutique de l'utilisation du NCS 613 dans le traitement du lupus. Au cours d'une telle étude, les effets indésirables liés à ce composé, mais également ses effets anti-inflammatoires et immuno-modulateurs. On pourrait également étudier la sécrétion d'auto-anticorps et du TNF $\alpha$  au cours de ces traitements avec le nouvel inhibiteur de PDE4.

Les résultats préliminaires de nos expériences suggèrent des effets relaxantes du NCS 613 sur la tonicité de base des bronches humaines rappelant celle de la théophylline qui a été utilisée dans le traitement de l'asthme. Il serait intéressant d'étudier l'effet relaxant du NCS 613 sur la tonicité de base des muscles lisses des voies respiratoires provenant de poumon de plusieurs patients. Dans le cas de la prévention de l'hyperréactivité par le NCS 613 pour approfondir notre compréhension, il serait intéressant de tester l'effet de ce composé dans un modèle *in vivo* d'asthme allergique chez le cobaye sensibilisé à l'ovalbumine.

Le NCS 613 a également montré des effets antiprolifératifs sur les cellules A549 et il serait intéressant de tester ses effets *in vivo*. Cela pourrait consister à injectant par voie sous cutanée des cellules A549 à des souris nudes (immunodéficientes) afin qu'elles développent des tumeurs. On pourra comparer la progression des tumeurs des souris traitées au NCS 613 à celles du groupe contrôle (non traitées).

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adamo CM, Dai DF, Percival JM, Minami E, Willis MS, Patrucco E, Froehner SC, Beavo JA.(2010) Sildenafil reverses cardiac dysfunction in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2;107(44):19079-19083.

Abrahamsen, H., Baillie, G., Ngai, J., Vang, T., Nika, K., Ruppelt, A., Mustelin, T., Zaccolo, M., Houslay, M., and Tasken, K. (2004). TCR- and CD28-mediated recruitment of phosphodiesterase 4 to lipid rafts potentiates TCR signaling. *J Immunol* 173, 4847-4858.

Al Arfaj, A.S., and Khalil, N. (2009). Clinical and immunological manifestations in 624 SLE patients in Saudi Arabia. *Lupus* 18, 465-473.

Abusnina A, Alhosin M, Keravis T, Muller CD, Fuhrmann G, Bronner C, Lugnier C. (2011). Down-regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE1A is the key event of p73 and UHRF1 deregulation in thymoquinone-induced acute lymphoblastic leukemia cell apoptosis. *Cell Signal.* J;23(1):152-160.

Alvarez E, Campos-Toimil M, Justiniano-Basaran H, Lugnier C, Orallo F. (2006) Study of the mechanisms involved in the vasorelaxation induced by (-)-epigallocatechin-3-gallate in rat aorta. *Br J Pharmacol.* 147(3):269-80.

Adderley, S.P., Sprague, R.S., Stephenson, A.H., and Hanson, M.S. (2010). Regulation of cAMP by phosphodiesterases in erythrocytes. *Pharmacol Rep* 62, 475-482.

Ahloulay, M., Bankir, L., Lugnier, C., Le Bec, A., Poirel, O., Moreau, R., and Lebrec, D. (2005). Cyclic AMP-phosphodiesterases inhibitor improves sodium excretion in rats with cirrhosis and ascites. *Liver Int* 25, 403-409.

Ahmed, S.A., and Verthelyi, D. (1993). Antibodies to cardiolipin in normal C57BL/6J mice: induction by estrogen but not dihydrotestosterone. *Journal of autoimmunity* 6, 265-279.

Alba, P., Bento, L., Cuadrado, M.J., Karim, Y., Tungekar, M.F., Abbs, I., Khamashta, M.A., D'Cruz, D., and Hughes, G.R. (2003). Anti-dsDNA, anti-Sm antibodies, and the lupus anticoagulant: significant factors associated with lupus nephritis. *Annals of the rheumatic diseases* 62, 556-560.

Arnett, F.C., Reveille, J.D., Moutsopoulos, H.M., Georgescu, L., and Elkon, K.B. (1996). Ribosomal P autoantibodies in systemic lupus erythematosus. Frequencies in different ethnic groups and clinical and immunogenetic associations. *Arthritis and rheumatism* 39, 1833-1839.

Avihingsanon, Y., and Hirankarn, N. (2010) Major lupus organ involvement: severe lupus nephritis. *Lupus* 19, 1391-1398.

Bagavant, H., and Fu, S.M. (2009). Pathogenesis of kidney disease in systemic lupus erythematosus. *Current opinion in rheumatology* 21, 489-494.

Bajpai M, Fiedler SE, Huang Z, Vijayaraghavan S, Olson GE, Livera G, Conti M, Carr DW.(2006). AKAP3 selectively binds PDE4A isoforms in bovine spermatozoa. *Biol Reprod*. ;74(1):109-118.

Balkwill, F., and Mantovani, A. (2010). Cancer and inflammation: implications for pharmacology and therapeutics. *Clinical pharmacology and therapeutics* 87, 401-406.

Baillie, G.S., MacKenzie, S.J., McPhee, I., and Houslay, M.D. (2000). Sub-family selective actions in the ability of Erk2 MAP kinase to phosphorylate and regulate the activity of PDE4 cyclic AMP-specific phosphodiesterases. *British journal of pharmacology* 131, 811-819.

Baillie GS. (2009). Compartmentalized signalling: spatial regulation of cAMP by the action of compartmentalized phosphodiesterases. *FEBS J*.276(7):1790-1799.

Barad, M., Bourtchouladze, R., Winder, D.G., Golan, H., and Kandel, E. (1998). Rolipram, a type IV-specific phosphodiesterase inhibitor, facilitates the establishment of long-lasting long-term potentiation and improves memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 15020-15025.

Barber, R., Baillie, G.S., Bergmann, R., Shepherd, M.C., Sepper, R., Houslay, M.D., and Heeke, G.V. (2004). Differential expression of PDE4 cAMP phosphodiesterase isoforms in inflammatory cells of smokers with COPD, smokers without COPD, and nonsmokers. *American journal of physiology* 287, L332-343.

Barczyk, K., Ehrchen, J., Tenbrock, K., Ahlmann, M., Kneidl, J., Viemann, D., and Roth, J. (2010) Glucocorticoids promote survival of anti-inflammatory macrophages via stimulation of adenosine receptor A3. *Blood* 116, 446-455.

Barnabe, C., Martin, B.J., and Ghali, W.A. (2010) Systematic review and meta-analysis: Anti-tumor necrosis factor alpha therapy and cardiovascular events in rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. [Epub ahead of print]

Barnes, P.J. (1998). Pharmacology of airway smooth muscle. *American journal of respiratory and critical care medicine* 158, S123-132.

Baumer, W., Hoppmann, J., Rundfeldt, C., and Kietzmann, M. (2007). Highly selective phosphodiesterase 4 inhibitors for the treatment of allergic skin diseases and psoriasis. *Inflammation & allergy drug targets* 6, 17-26.

Beavo, J.A., Conti, M., and Heaslip, R.J. (1994). Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Molecular pharmacology* 46, 399-405.

Beltman, J., Becker, D.E., Butt, E., Jensen, G.S., Rybalkin, S.D., Jastorff, B., and Beavo, J.A. (1995). Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases with cyclic GMP analogs: topology of the catalytic domains. *Molecular pharmacology* 47, 330-339.

Bender, A.T., and Beavo, J.A. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. *Pharmacological reviews* 58, 488-520.

Berman, H.M., Ten Eyck, L.F., Goodsell, D.S., Haste, N.M., Kornev, A., and Taylor, S.S. (2005). The cAMP binding domain: an ancient signaling module. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 45-50.

Berthet, J., Sutherland, E.W., and Rall, T.W. (1957). The assay of glucagon and epinephrine with use of liver homogenates. *The Journal of biological chemistry* 229, 351-361.

Biel, M., Schneider, A., and Wahl, C. (2002). Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends in cardiovascular medicine* 12, 206-212.

Birschmann, I., and Walter, U. (2004). Physiology and pathophysiology of vascular signaling controlled by guanosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent protein kinase. *Acta biochimica Polonica* 51, 397-404.

Bjorgo E, Solheim SA, Abrahamsen H, Baillie GS, Brown KM, Berge T, Okkenhaug K, Houslay MD, Taskén K. (2010). Cross talk between phosphatidylinositol 3-kinase and cyclic AMP (cAMP)-protein kinase a signaling pathways at the level of a protein kinase B/beta-arrestin/cAMP phosphodiesterase 4 complex. *Mol Cell Biol.*;30(7):1660-1672.

Bjorgo, E., and Tasken, K. (2006). Role of cAMP phosphodiesterase 4 in regulation of T-cell function. *Critical reviews in immunology* 26, 443-451.

Blasini, A.M., Alonzo, E., Chacon, R., Riera, R., Stekman, I.L., and Rodriguez, M.A. (1998). Abnormal pattern of tyrosine phosphorylation in unstimulated peripheral blood T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus* 7, 515-523.

Boichot, E., Wallace, J.L., Germain, N., Corbel, M., Lugnier, C., Lagente, V., and Bourguignon, J.J. (2000). Anti-inflammatory activities of a new series of selective phosphodiesterase 4 inhibitors derived from 9-benzyladenine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 292, 647-653.

Bopp, T., Dehzad, N., Reuter, S., Klein, M., Ullrich, N., Stassen, M., Schild, H., Buhl, R., Schmitt, E., and Taube, C. (2009). Inhibition of cAMP degradation improves regulatory T cell-mediated suppression. *J Immunol* 182, 4017-4024.

Borlaug, B.A., Melenovsky, V., Marhin, T., Fitzgerald, P., and Kass, D.A. (2005). Sildenafil inhibits beta-adrenergic-stimulated cardiac contractility in humans. *Circulation* 112, 2642-2649.

Boswell-Smith, V., and Spina, D. (2007). PDE4 inhibitors as potential therapeutic agents in the treatment of COPD-focus on roflumilast. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* 2, 121-129.

Burnouf, C., and Pruniaux, M.P. (2002). Recent advances in PDE4 inhibitors as immunoregulators and anti-inflammatory drugs. *Current pharmaceutical design* 8, 1255-1296.

Busse, W.W. (2010). The relationship of airway hyperresponsiveness and airway inflammation: Airway hyperresponsiveness in asthma: its measurement and clinical significance. *Chest* 138, 4S-10S.

Brown, D.M., Hutchison, L., Donaldson, K., MacKenzie, S.J., Dick, C.A., and Stone, V. (2007). The effect of oxidative stress on macrophages and lung epithelial cells: the role of phosphodiesterases 1 and 4. *Toxicology letters* 168, 1-6.

Campos-Toimil, M., Keravis, T., Orallo, F., Takeda, K., and Lugnier, C. (2008). Short-term or long-term treatments with a phosphodiesterase-4 (PDE4) inhibitor result in opposing agonist-induced Ca(2+) responses in endothelial cells. *British journal of pharmacology* 154, 82-92.

Campos-Toimil M, Lugnier C, Droy-Lefaix MT, Takeda K. (2000). Inhibition of type 4 phosphodiesterase by rolipram and Ginkgo biloba extract (EGb 761) decreases agonist-induced rises in internal calcium in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20(9):E34-E40.

Cann, M.J. (2007). Sodium regulation of GAF domain function. *Biochemical Society transactions* 35, 1032-1034.

Castro, A., Jerez, M.J., Gil, C., and Martinez, A. (2005). Cyclic nucleotide phosphodiesterases and their role in immunomodulatory responses: advances in the development of specific phosphodiesterase inhibitors. *Medicinal research reviews* 25, 229-244.

Castro, L.R., Verde, I., Cooper, D.M., and Fischmeister, R. (2006). Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes. *Circulation* 113, 2221-2228.

Chavez-Rueda, K., Legorreta-Haquet, M.V., Cervera-Castillo, H., Sanchez, L., Jara, L.J., Zenteno, E., and Blanco-Favela, F. (2005). Prolactin effect on CD69 and CD154 expression by CD4+ cells from systemic lupus erythematosus patients. *Clinical and experimental rheumatology* 23, 769-777.

Chakir, J., Shannon, J., Molet, S., Fukakusa, M., Elias, J., Laviolette, M., Boulet, L.P., and Hamid, Q. (2003). Airway remodeling-associated mediators in moderate to severe asthma: effect of steroids on TGF-beta, IL-11, IL-17, and type I and type III collagen expression. *The Journal of allergy and clinical immunology* 111, 1293-1298.

Cheng, D., Ren, J., Gillespie, D.G., Mi, Z., and Jackson, E.K. (2010). Regulation of 3',5'-cAMP in preglomerular smooth muscle and endothelial cells from genetically hypertensive rats. *Hypertension* 56, 1096-1101.

Christensen, A.E., Selheim, F., de Rooij, J., Dremier, S., Schwede, F., Dao, K.K., Martinez, A., Maenhaut, C., Bos, J.L., Genieser, H.G., *et al.* (2003). cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *The Journal of biological chemistry* 278, 35394-35402.

Ciszak, L., Pawlak, E., Kosmaczewska, A., Potoczek, S., and Frydecka, I. (2007). Alterations in the expression of signal-transducing CD3 zeta chain in T cells from patients with chronic inflammatory/autoimmune diseases. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis* 55, 373-386.



Conti M, Beavo J. (2007). Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. *Annu Rev Biochem.*;76:481-511.

Coquil, J.F., Virmaux, N., Mandel, P., and Goridis, C. (1975). Cyclic nucleotide phosphodiesterase of retinal photoreceptors. Partial purification and some properties of the enzyme. *Biochimica et biophysica acta* 403, 425-437.

Cooper, N., Teixeira, M.M., Warneck, J., Miotla, J.M., Wills, R.E., Macari, D.M., Gristwood, R.W., and Hellewell, P.G. (1999). A comparison of the inhibitory activity of PDE4 inhibitors on leukocyte PDE4 activity in vitro and eosinophil trafficking in vivo. *British journal of pharmacology* 126, 1863-1871.

Cramer, N., Wiehlmann, L., and Tummler, (2010). B. Clonal epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Int J Med Microbiol.* ;300(8):526-33..

Crispin, J.C., Kyttaris, V., Juang, Y.T., and Tsokos, G.C. (2007). Systemic lupus erythematosus: new molecular targets. *Annals of the rheumatic diseases* 66 *Suppl* 3, iii65-69.  
Cunningham, M., and Gilkeson, G. Estrogen Receptors in Immunity and Autoimmunity. *Clinical reviews in allergy & immunology*.

de Carvalho, J.F., do Nascimento, A.P., Testagrossa, L.A., Barros, R.T., and Bonfa, E. (2010). Male gender results in more severe lupus nephritis. *Rheumatology international* 30, 1311-1315.

de Rooij, J., Zwartkruis, F.J., Verheijen, M.H., Cool, R.H., Nijman, S.M., Wittinghofer, A., and Bos, J.L. (1998). Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396, 474-477.

Degerman, E., Belfrage, P., and Manganiello, V.C. (1997). Structure, localization, and regulation of cGMP-inhibited phosphodiesterase (PDE3). *The Journal of biological chemistry* 272, 6823-6826.

Devauchelle-Pensec, V., Pers, J.O., Youinou, P., and Saraux, A. (2008). [Is rituximab a promising treatment for Sjogren's syndrome?]. *Medecine interne* 29, 967-970.

Dodge-Kafka, K.L., Soughayer, J., Pare, G.C., Carlisle Michel, J.J., Langeberg, L.K., Kapiloff, M.S., and Scott, J.D. (2005). The protein kinase A anchoring protein mAKAP coordinates two integrated cAMP effector pathways. *Nature* 437, 574-578.

Dodge, K.L., Khouangsathiene, S., Kapiloff, M.S., Mouton, R., Hill, E.V., Houslay, M.D., Langeberg, L.K., and Scott, J.D. (2001). mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. *The EMBO journal* 20, 1921-1930.

Enns, L.C., Pettan-Brewer, C., and Ladiges, W. (2010). Protein kinase A is a target for aging and the aging heart. *Aging* 2, 238-243.



- Essayan, D.M., Huang, S.K., Kagey-Sobotka, A., and Lichtenstein, L.M. (1997). Differential efficacy of lymphocyte- and monocyte-selective pretreatment with a type 4 phosphodiesterase inhibitor on antigen-driven proliferation and cytokine gene expression. *The Journal of allergy and clinical immunology* *99*, 28-37.
- Fabbri LM, Beghé B, Yasothan U, Kirkpatrick P. (2010) Roflumilast. *Nat Rev Drug Discov.* (10):761-762.
- Favot L, Keravis T, Lugnier C. (2004). Modulation of VEGF-induced endothelial cell cycle protein expression through cyclic AMP hydrolysis by PDE2 and PDE4. *Thromb Haemost.* *92*(3):634-645.
- Fawcett, L., Baxendale, R., Stacey, P., McGrouther, C., Harrow, I., Soderling, S., Hetman, J., Beavo, J.A., and Phillips, S.C. (2000). Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 3702-3707.
- Feng, J.B., Ni, J.D., Yao, X., Pan, H.F., Li, X.P., Xu, J.H., Pan, F.M., Xu, S.Q., and Ye, D.Q. (2010). Gender and age influence on clinical and laboratory features in Chinese patients with systemic lupus erythematosus: 1,790 cases. *Rheumatology international* *30*, 1017-1023.
- Ferrero-Miliani, L., Nielsen, O.H., Andersen, P.S., and Girardin, S.E. (2007). Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. *Clinical and experimental immunology* *147*, 227-235.
- Fireman, P. (2003). Understanding asthma pathophysiology. *Allergy Asthma Proc* *24*, 79-83.
- Fong, K.Y., and Thumboo, J. (2010) Neuropsychiatric lupus: clinical challenges, brain-reactive autoantibodies and treatment strategies. *Lupus* *19*, 1399-1403
- Fujishige, K., Kotera, J., Michibata, H., Yuasa, K., Takebayashi, S., Okumura, K., and Omori, K. (1999). Cloning and characterization of a novel human phosphodiesterase that hydrolyzes both cAMP and cGMP (PDE10A). *The Journal of biological chemistry* *274*, 18438-18445.
- Galli, S.J., Tsai, M., and Piliponsky, A.M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature* *454*, 445-454.
- Gan, T.J. (2010). Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. *Current medical research and opinion* *26*, 1715-1731.
- Gambaryan, S., Geiger, J., Renne, T., and Walter, U. (2008). Inhibition of platelets by insulin? A reply to a rebuttal letter. *J Thromb Haemost.*
- Gerli, R., and Caponi, L. (2005). Anti-ribosomal P protein antibodies. *Autoimmunity* *38*, 85-92.
- Ghirardello, A., Doria, A., Zampieri, S., Gambari, P.F., and Todesco, S. (2001). Autoantibodies to ribosomal P proteins in systemic lupus erythematosus. *Isr Med Assoc J* *3*, 854-857.

Ghofrani HA, Grimminger F. (2009). Modulating cGMP to treat lung diseases. *Handb Exp Pharmacol.*;(191):469-483.

Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., and Parks, W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 51, 1417-1423.

Giannakakis K, Faraggiana T. (2010) Histopathology of Lupus Nephritis. *Clin Rev Allergy Immunology*.

Gibson, P.G., McDonald, V.M., and Marks, G.B. (2010). Asthma in older adults. *Lancet* 376, 803-813.

Gong, B., Vitolo, O.V., Trinchese, F., Liu, S., Shelanski, M., and Arancio, O. (2004). Persistent improvement in synaptic and cognitive functions in an Alzheimer mouse model after rolipram treatment. *The Journal of clinical investigation* 114, 1624-1634.

Gonzalez, A., Fernandez, A., Guardia, S., and Sala, H. (2010). Supramaximal Flows: Comparison between Asthmatics and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Respiration*; international review of thoracic diseases. 2010 Oct 15. [Epub ahead of print]

Grandoch, M., Roscioni, S.S., and Schmidt, M. (2010). The role of Epac proteins, novel cAMP mediators, in the regulation of immune, lung and neuronal function. *British journal of pharmacology* 159, 265-284.

Greenstein, B.D., Dhaher, Y.Y., Bridges Ede, F., Keser, G., Khamashta, M.A., Etherington, J., Greenstein, A.S., Coates, P.J., Hall, P.A., and Hughes, G.R. (1993). Effects of an aromatase inhibitor on thymus and kidney and on oestrogen receptors in female MRL/MP-lpr/lpr mice. *Lupus* 2, 221-225.

Grolleau, A., Kaplan, M.J., Hanash, S.M., Beretta, L., and Richardson, B. (2000). Impaired translational response and increased protein kinase PKR expression in T cells from lupus patients. *The Journal of clinical investigation* 106, 1561-1568.

Gross-Langenhoff, M., Hofbauer, K., Weber, J., Schultz, A., and Schultz, J.E. (2006). cAMP is a ligand for the tandem GAF domain of human phosphodiesterase 10 and cGMP for the tandem GAF domain of phosphodiesterase 11. *The Journal of biological chemistry* 281, 2841-2846.

Guabiraba, R., Campanha-Rodrigues, A.L., Souza, A.L., Santiago, H.C., Lugnier, C., Alvarez-Leite, J., Lemos, V.S., and Teixeira, M.M. (2010). The flavonoid dioclein reduces the production of pro-inflammatory mediators in vitro by inhibiting PDE4 activity and scavenging reactive oxygen species. *European journal of pharmacology* 633, 85-92.

Guibert C, Savineau JP, Crevel H, Marthan R, Rousseau E. (2005). Effect of short-term organoid culture on the pharmaco-mechanical properties of rat extra- and intrapulmonary arteries. *Br J Pharmacol.* 146(5):692-701.

Guse, A.H. (2004a). Biochemistry, biology, and pharmacology of cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Current medicinal chemistry* 11, 847-855.

Guse, A.H. (2004b). Regulation of calcium signaling by the second messenger cyclic adenosine diphosphoribose (cADPR). *Current molecular medicine* 4, 239-248.

Hanrotel-Saliou, C., Segalen, I., Le Meur, Y., Youinou, P., and Renaudineau, Y. (2010). Glomerular Antibodies in Lupus Nephritis. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2010 Apr 23. [Epub ahead of print]. PMID: 20414746

Hartshorne, D.J., Ito, M., and Erdodi, F. (1998). Myosin light chain phosphatase: subunit composition, interactions and regulation. *Journal of muscle research and cell motility* 19, 325-341.

Halene, T.B., and Siegel, S.J. (2008). Antipsychotic-like properties of phosphodiesterase 4 inhibitors: evaluation of 4-(3-butoxy-4-methoxybenzyl)-2-imidazolidinone (RO-20-1724) with auditory event-related potentials and prepulse inhibition of startle. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 326, 230-239.

Hasler, F. (1990). Immunoreactive circulating alpha-interferon in rheumatoid arthritis. *British journal of rheumatology* 29, 315-316.

Hatzelmann, A., and Schudt, C. (2001). Anti-inflammatory and immunomodulatory potential of the novel PDE4 inhibitor roflumilast in vitro. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 297, 267-279.

Haworth, R.S., Cuello, F., and Avkiran, M. (2010). Regulation by phosphodiesterase isoforms of protein kinase A-mediated attenuation of myocardial protein kinase D activation. *Basic research in cardiology*.

Hayes, J.S., Brunton, L.L., and Mayer, S.E. (1980). Selective activation of particulate cAMP-dependent protein kinase by isoproterenol and prostaglandin E1. *The Journal of biological chemistry* 255, 5113-5119.

He, R., Komasa, N., Ekholm, D., Murata, T., Taira, M., Hockman, S., Degerman, E., and Manganiello, V.C. (1998). Expression and characterization of deletion recombinants of two cGMP-inhibited cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDE-3). *Cell biochemistry and biophysics* 29, 89-111.

Heikaus, C.C., Pandit, J., and Klevit, R.E. (2009). Cyclic nucleotide binding GAF domains from phosphodiesterases: structural and mechanistic insights. *Structure* 17, 1551-1557.

Hertz AL, Bender AT, Smith KC, Gilchrist M, Amieux PS, Aderem A, Beavo JA. (2009) Elevated cyclic AMP and PDE4 inhibition induce chemokine expression in human monocyte-derived macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22;106(51):21978-21983.

Hewagama, A., and Richardson, B. (2009). The genetics and epigenetics of autoimmune diseases. *Journal of autoimmunity* 33, 3-11.

Hofbauer, K., Schultz, A., and Schultz, J.E. (2008). Functional chimeras of the phosphodiesterase 5 and 10 tandem GAF domains. *The Journal of biological chemistry* 283, 25164-25170.

- Holley, A.D., and Boots, R.J. (2009). Review article: management of acute severe and near-fatal asthma. *Emerg Med Australas* 21, 259-268.
- Houslay, M.D. (2010). Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown. *Trends in biochemical sciences*. 35, 91-100.
- Houslay MD. (2009). Arrestin times for developing antipsychotics and beta-blockers. *Sci Signal*.14;2(66):pe22.
- Houslay MD, Baillie GS, Maurice DH. (2007).cAMP-Specific phosphodiesterase-4 enzymes in the cardiovascular system: a molecular toolbox for generating compartmentalized cAMP signaling. *Circ Res*. 13;100(7):950-966. Review
- Houslay MD, Schafer P, Zhang KY. (2005). Keynote review: phosphodiesterase-4 as a therapeutic target. *Drug Discov Today*. 15;10(22):1503- 1519.
- Hutchinson, A.F., Thompson, M.A., Brand, C.A., Black, J., Anderson, G.P., and Irving, L.B. (2010) Community care assessment of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of advanced nursing* 66, 2490-2499.
- Ishii, T., Wakabayashi, R., Kurosaki, H., Gemma, A., and Kida, K. (2010). Association of serotonin transporter gene variation with smoking, chronic obstructive pulmonary disease, and its depressive symptoms. *Journal of human genetics*. 2010 Oct 28. [Epub ahead of print]
- Ishiwata, N., Noguchi, K., Kawanishi, M., Asakura, Y., Hori, M., Mitani, A., Ito, Y., Takahashi, K., Nishiyama, H., Shudo, N., *et al.* (2007). NT-702 (parogrelil hydrochloride, NM-702), a novel and potent phosphodiesterase inhibitor, improves reduced walking distance and lowered hindlimb plantar surface temperature in a rat experimental intermittent claudication model. *Life sciences* 81, 970-978.
- Jeon, Y.H., Heo, Y.S., Kim, C.M., Hyun, Y.L., Lee, T.G., Ro, S., and Cho, J.M. (2005). Phosphodiesterase: overview of protein structures, potential therapeutic applications and recent progress in drug development. *Cell Mol Life Sci* 62, 1198-1220.
- Jin, S.L., Lan, L., Zoudilova, M., and Conti, M. (2005). Specific role of phosphodiesterase 4B in lipopolysaccharide-induced signaling in mouse macrophages. *J Immunol* 175, 1523-1531.
- Kamata, H., Tsuchiya, Y., and Asano, T. (2010). IkappaBbeta is a positive and negative regulator of NF-kappaB activity during inflammation. *Cell research* 20, 1178-1180.
- Kamen, D.L., and Alele, J.D. (2010). Skeletal manifestations of systemic autoimmune diseases. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity* 17, 540-545.
- Kamenetsky, M., Middelhaufe, S., Bank, E.M., Levin, L.R., Buck, J., and Steegborn, C. (2006). Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *Journal of molecular biology* 362, 623-639.
- Kaupp, U.B., and Seifert, R. (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiological reviews* 82, 769-824.

- Keravis, T., Komasa, N., and Lugnier, C. (2000). Cyclic nucleotide hydrolysis in bovine aortic endothelial cells in culture: differential regulation in cobblestone and spindle phenotypes. *Journal of vascular research* 37, 235-249.
- Keravis, T., Thaseldar-Roumie, R., and Lugnier, C. (2005). Assessment of phosphodiesterase isozyme contribution in cell and tissue extracts. *Methods Mol Biol* 307, 63-74.
- Klinger, M.B., Sacks, S., and Cervero, F. (2010). A role for extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 in the maintenance of persistent mechanical hyperalgesia in ovariectomized mice. *Neuroscience*.
- Koitaishi, N., Aiba, T., Hesketh, G.G., Rowell, J., Zhang, M., Takimoto, E., Tomaselli, G.F., and Kass, D.A. (2010). Cyclic GMP/PKG-dependent inhibition of TRPC6 channel activity and expression negatively regulates cardiomyocyte NFAT activation. Novel mechanism of cardiac stress modulation by PDE5 inhibition. *Journal of molecular and cellular cardiology* 48, 713-724.
- Kojda, G., and Kottenberg, K. (1999). Regulation of basal myocardial function by NO. *Cardiovascular research* 41, 514-523.
- Komasa N, Le Bec A, Stoclet JC, Lugnier C. (1991) Cardiac cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases: effects of cGMP analogues and drugs. *Eur J Pharmacol.* 25;206(1):5-13.
- Komasa N, Lugnier C, Le Bec A, Serradeil-Le Gal C, Barthélémy G, Stoclet JC. (1989). Differential sensitivity to cardiotoxic drugs of cyclic AMP phosphodiesterases isolated from canine ventricular and sinoatrial-enriched tissues. *J Cardiovasc Pharmacol.* 14(2):213-220.
- Krishnan, S., Juang, Y.T., Chowdhury, B., Magilavy, A., Fisher, C.U., Nguyen, H., Nambiar, M.P., Kyttaris, V., Weinstein, A., Bahjat, R., *et al.* (2008). Differential expression and molecular associations of Syk in systemic lupus erythematosus T cells. *J Immunol* 181, 8145-8152.
- Kroegel, C., and Foerster, M. (2007). Phosphodiesterase-4 inhibitors as a novel approach for the treatment of respiratory disease: cilomilast. *Expert opinion on investigational drugs* 16, 109-124.
- Lakics, V., Karran, E.H., and Boess, F.G. (2010). Quantitative comparison of phosphodiesterase mRNA distribution in human brain and peripheral tissues. *Neuropharmacology* 59, 367-374.
- Lapeyre, A.C., 3rd, Goraya, T.Y., Johnston, D.L., and Gibbons, R.J. (2004). The impact of caffeine on vasodilator stress perfusion studies. *J Nucl Cardiol* 11, 506-511.
- Lehnart SE, Wehrens XH, Reiken S, Warrier S, Belevych AE, Harvey RD, Richter W, Jin SL, Conti M, Marks AR. (2005). Phosphodiesterase 4D deficiency in the ryanodine-receptor complex promotes heart failure and arrhythmias. *Cell.* 7;123(1):25-35.

- Li, Y.P., Vegge, C.S., Brondsted, L., Madsen, M., Ingmer, H., and Bang, D.D. (2010). *Campylobacter jejuni* induces an anti-inflammatory response in human intestinal epithelial cells through activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Veterinary microbiology*.
- Li X, Vadrevu S, Dunlop A, Day J, Advant N, Troeger J, Klusmann E, Jaffrey E, Hay RT, Adams DR, Houslay MD, Baillie GS. (2010). Selective SUMO modification of cAMP-specific phosphodiesterase-4D5 (PDE4D5) regulates the functional consequences of phosphorylation by PKA and ERK. *Biochem J.* 28;428(1):55-65.
- Lieberman, L.A., and Tsokos, G.C. (2010). The IL-2 defect in systemic lupus erythematosus disease has an expansive effect on host immunity. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2010, 740619.
- Link, A., Selejan, S., Maack, C., Lenz, M., and Bohm, M. (2008). Phosphodiesterase 4 inhibition but not beta-adrenergic stimulation suppresses tumor necrosis factor-alpha release in peripheral blood mononuclear cells in septic shock. *Critical care (London, England)* 12, R159.
- Liu, Y., Yang, H.F., and Wang, L.X. (2010). Pathological classification and clinical characteristics of lupus nephritis: a report of 49 cases. *Journal of Southern Medical University* 30, 1915-1917.
- Lopez, A.D., and Mathers, C.D. (2006). Measuring the global burden of disease and epidemiological transitions: 2002-2030. *Annals of tropical medicine and parasitology* 100, 481-499.
- Lopez, A.D., Mathers, C.D., Ezzati, M., Jamison, D.T., and Murray, C.J. (2006a). Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *Lancet* 367, 1747-1757.
- Lopez, A.D., Shibuya, K., Rao, C., Mathers, C.D., Hansell, A.L., Held, L.S., Schmid, V., and Buist, S. (2006b). Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections. *Eur Respir J* 27, 397-412.
- Lucas, K.A., Pitari, G.M., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart, I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K.P., and Waldman, S.A. (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacological reviews* 52, 375-414.
- Lugnier, C, Muller , F. Monneaux F, Bourguignon JJ, inventeurs. Cessionnaire CNRS. « Utilisation de composés dérivés de l'adénine pour le traitement du lupus »" PCT/FR2007/ le 6 mars 2007. Publié le 4 juillet 2008, INPI N° 0601958.
- Lugnier, C. (2006). Cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) superfamily: a new target for the development of specific therapeutic agents. *Pharmacology & therapeutics* 109, 366-398.
- Lugnier C, Keravis T, Le Bec A, Pauvert O, Proteau S, Rousseau E. (1999). Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms associated to isolated cardiac nuclei. *Biochim Biophys Acta.*16;1472(3):431-446.



Lugnier C, Komasa N. (1993) Modulation of vascular cyclic nucleotide phosphodiesterases by cyclic GMP: role in vasodilatation. *Eur Heart J.* 14,141-148.

Lugnier, C., and Schini, V.B. (1990). Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterases from cultured bovine aortic endothelial cells. *Biochemical pharmacology* 39, 75-84.

Lugnier C, Schoeffter P, Le Bec A, Strouthou E, Stoclet JC. (1986). Selective inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterases of human, bovine and rat aorta. *Biochem Pharmacol.* 15;35(10):1743-1751.

Lynch, M.J., Baillie, G.S., Mohamed, A., Li, X., Maisonneuve, C., Klusmann, E., van Heeke, G., and Houslay, M.D. (2005). RNA silencing identifies PDE4D5 as the functionally relevant cAMP phosphodiesterase interacting with beta arrestin to control the protein kinase A/AKAP79-mediated switching of the beta2-adrenergic receptor to activation of ERK in HEK293B2 cells. *The Journal of biological chemistry* 280, 33178-33189.

Mehats, C., Jin, S.L., Wahlstrom, J., Law, E., Umetsu, D.T., and Conti, M. (2003). PDE4D plays a critical role in the control of airway smooth muscle contraction. *Faseb J* 17, 1831-1841.

MacKenzie SJ, Houslay MD. (2000). Action of rolipram on specific PDE4 cAMP phosphodiesterase isoforms and on the phosphorylation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase in U937 monocytic cells. *Biochem J.* 15;347(Pt 2):571-578.

McCann, F.E., Palfreeman, A.C., Andrews, M., Perocheau, D.P., Inglis, J.J., Schafer, P., Feldmann, M., Williams, R.O., and Brennan, F.M. (2010). Apremilast, a novel PDE4 inhibitor, inhibits spontaneous production of tumour necrosis factor-alpha from human rheumatoid synovial cells and ameliorates experimental arthritis. *Arthritis research & therapy* 12, R107.

Medical Physiology, WF Boron, EL Boulpaep, Saunders, Elsevier Science, 2003, chap. 32, p. 749).

Marieb Elaine N. . Anatomie et physiologie humaine - Adaptation de la 6ème édition américaine. Pearson Education | juin 2010. Chapitre: physiologie du rein.

McCahill AC, Huston E, Li X, Houslay MD. (2008). PDE4 associates with different scaffolding proteins: modulating interactions as treatment for certain diseases. *Handb Exp Pharmacol.* (186):125-1266.

Miller CL, Oikawa M, Cai Y, Wojtovich AP, Nagel DJ, Xu X, Xu H, Florio V, Rybalkin SD, Beavo JA, Chen YF, Li JD, Blaxall BC, Abe J, Yan C. (2009). Role of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase 1 in mediating cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res.* 6;105(10):956-964.



Mokni W, Keravis T, Etienne-Selloum N, Walter A, Kane MO, Schini-Kerth VB, Lugnier C. (2010). Concerted regulation of cGMP and cAMP phosphodiesterases in early cardiac hypertrophy induced by angiotensin II. *Plos One* 2010, in press

Moncada, S., Ferreira, S.H., and Vane, J.R. (1975). Inhibition of prostaglandin biosynthesis as the mechanism of analgesia of aspirin-like drugs in the dog knee joint. *European journal of pharmacology* 31, 250-260.

Monneaux F, Keravis T, Bourguignon JJ, Muller S, Lugnier C. (2008) Disease progression in MRL/lpr lupus-prone mice is reduced by a Specific PDE4 inhibitor IXth World Conference on Clinical Pharmacology and Therapeutics – CPT 2008, July 27 - August 1, 2008 Québec. *Can J Clin Pharmacol* 15, 206.

Monneaux, F., Parietti, V., Briand, J.P., and Muller, S. (2004). Intramolecular T cell spreading in unprimed MRL/lpr mice: importance of the U1-70k protein sequence 131-151. *Arthritis and rheumatism* 50, 3232-3238.

Moorthy, B.S., Gao, Y., and Anand, G.S. (2010). Phosphodiesterases catalyze hydrolysis of cAMP-bound to regulatory subunit of protein kinase A and mediate signal termination. *Mol Cell Proteomics*.

Montorsi, F., Corbin, J., and Phillips, S. (2004). Review of phosphodiesterases in the urogenital system: new directions for therapeutic intervention. *The journal of sexual medicine* 1, 322-336.

Morin, C., Sirois, M., Echave, V., Rizcallah, E., and Rousseau, E. (2009). Relaxing effects of 17(18)-EpETE on arterial and airway smooth muscles in human lung. *American journal of physiology* 296, L130-139.

Morin, C., Sirois, M., Echave, V., and Rousseau, E. (2008). CPI-17 silencing-reduced responsiveness in control and TNF-alpha-treated human bronchi. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 39, 638-643.

Morin C, Proteau S, Rousseau E, Brayden J. (2005). Organ-cultured airway explants: a new model of airway hyperresponsiveness. *Exp Lung Res.* 31(7):719-44.

Movsesian M, Stehlik J, Vandeput F, Bristow MR. (2009). Phosphodiesterase inhibition in heart failure. *Heart Fail Rev.* 14(4):255-263.

Muller, B., Stoclet, J.C., and Lugnier, C. (1992). Cytosolic and membrane-bound cyclic nucleotide phosphodiesterases from guinea pig cardiac ventricles. *European journal of pharmacology* 225, 263-272.

Murthy, K.S. (2006). Signaling for contraction and relaxation in smooth muscle of the gut. *Annual review of physiology* 68, 345-374.

Morin F, Lugnier C, Kameni J, Voisin P. (2001). Expression and role of phosphodiesterase 6 in the chicken pineal gland. *J Neurochem.* 78(1):88-99.

- Nicolaou, S.A., Szigligeti, P., Neumeier, L., Lee, S.M., Duncan, H.J., Kant, S.K., Mongey, A.B., Filipovich, A.H., and Conforti, L. (2007). Altered dynamics of Kv1.3 channel compartmentalization in the immunological synapse in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 179, 346-356.
- Negro, A., Dodge-Kafka, K., and Kapiloff, M.S. (2008). Signalosomes as Therapeutic Targets. *Progress in pediatric cardiology* 25, 51-56.
- Ng, S.C., and Chan, F.K. (2010). NSAID-induced gastrointestinal and cardiovascular injury. *Current opinion in gastroenterology* 26, 611-617.
- Niemir, Z.I., and Wagrowska-Danilewicz, M. (2010). Renal involvement in systemic lupus erythematosus. *Pol Merkur Lekarski* 28, 144-151.
- Nishikimi, T., Maeda, N., and Matsuoka, H. (2006). The role of natriuretic peptides in cardioprotection. *Cardiovascular research* 69, 318-328.
- Paisansinsup, T., Deshmukh, U.S., Chowdhary, V.R., Luthra, H.S., Fu, S.M., and David, C.S. (2002). HLA class II influences the immune response and antibody diversification to Ro60/Sjogren's syndrome-A: heightened antibody responses and epitope spreading in mice expressing HLA-DR molecules. *J Immunol* 168, 5876-5884.
- Pagès L, Gavaldà A, Lehner MD. (2009). PDE4 inhibitors: a review of current developments (2005- 2009). *Expert Opin Ther Pat. Cell.* 7;123(1):25-35. *Expert Opin Ther Pat.*;19(11):1501-19.
- Pare, G.C., Bauman, A.L., McHenry, M., Michel, J.J., Dodge-Kafka, K.L., and Kapiloff, M.S. (2005). The mA<sub>K</sub>AP complex participates in the induction of cardiac myocyte hypertrophy by adrenergic receptor signaling. *Journal of cell science* 118, 5637-5646.
- Parietti V, Monneaux F, Décossas M, Muller S. (2008) Function of CD4<sup>+</sup>,CD25<sup>+</sup> Treg cells in MRL/lpr mice is compromised by intrinsic defects in antigen-presenting cells and effector T cells. *Arthritis Rheum.* 58(6):1751-61.
- Pauvert O, Bonnet S, Rousseau E, Marthan R, Savineau JP. (2004). Sildenafil alters calcium signaling and vascular tone in pulmonary arteries from chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 287(3):L577-L583.
- Pauvert O, Lugnier C, Keravis T, Marthan R, Rousseau E, Savineau JP. (2003). *Br J Pharmacol.* 139(3):513-22. Effect of sildenafil on cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, vascular tone and calcium signaling in rat pulmonary artery. 139(3):513-22.
- Pauvert O, Salvail D, Rousseau E, Lugnier C, Marthan R, Savineau JP. (2002). *Biochem Pharmacol.* Characterisation of cyclic nucleotide phosphodiesterase isoforms in the media layer of the main pulmonary artery. 1;63(9):1763-72.
- Pers, J.O., Daridon, C., Bendaoud, B., Devauchelle, V., Berthou, C., Saraux, A., and Youinou, P. (2008). B-cell depletion and repopulation in autoimmune diseases. *Clinical reviews in allergy & immunology* 34, 50-55.

- Petrovic, M.M., Vales, K., Putnikovic, B., Djulejic, V., and Mitrovic, D.M. (2008). Ryanodine receptors, voltage-gated calcium channels and their relationship with protein kinase A in the myocardium. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 57, 141-149.
- Rao, Y.J., and Xi, L. (2009). Pivotal effects of phosphodiesterase inhibitors on myocyte contractility and viability in normal and ischemic hearts. *Acta pharmacologica Sinica* 30, 1-24.
- Reff, M.E., Carner, K., Chambers, K.S., Chinn, P.C., Leonard, J.E., Raab, R., Newman, R.A., Hanna, N., and Anderson, D.R. (1994). Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood* 83, 435-445.
- Reynolds, J.A., Toescu, V., Yee, C.S., Prabu, A., Situnayake, D., and Gordon, C. (2009). Effects of rituximab on resistant SLE disease including lung involvement. *Lupus* 18, 67-73.
- Rhen, T., and Cidlowski, J.A. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. *The New England journal of medicine* 353, 1711-1723.
- Rich, T.C., and Karpen, J.W. (2002). Review article: cyclic AMP sensors in living cells: what signals can they actually measure? *Annals of biomedical engineering* 30, 1088-1099.
- Richter, W., Day, P., Agrawal, R., Bruss, M.D., Granier, S., Wang, Y.L., Rasmussen, S.G., Horner, K., Wang, P., Lei, T., *et al.* (2008). Signaling from beta1- and beta2-adrenergic receptors is defined by differential interactions with PDE4. *The EMBO journal* 27, 384-393.
- Rider, V., and Abdou, N.I. (2001). Gender differences in autoimmunity: molecular basis for estrogen effects in systemic lupus erythematosus. *International immunopharmacology* 1, 1009-1024.
- Rivet-Bastide, M., Vandecasteele, G., Hatem, S., Verde, I., Benardeau, A., Mercadier, J.J., and Fischmeister, R. (1997). cGMP-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase regulates the basal calcium current in human atrial myocytes. *The Journal of clinical investigation* 99, 2710-2718.
- Rybalkin, S.D., Rybalkina, I., Beavo, J.A., and Bornfeldt, K.E. (2002). Cyclic nucleotide phosphodiesterase 1C promotes human arterial smooth muscle cell proliferation. *Circulation research* 90, 151-157.
- Sanna, G., Bertolaccini, M.L., Cuadrado, M.J., Laing, H., Khamashta, M.A., Mathieu, A., and Hughes, G.R. (2003). Neuropsychiatric manifestations in systemic lupus erythematosus: prevalence and association with antiphospholipid antibodies. *The Journal of rheumatology* 30, 985-992.
- Sanz, M.J., Cortijo, J., and Morcillo, E.J. (2005). PDE4 inhibitors as new anti-inflammatory drugs: effects on cell trafficking and cell adhesion molecules expression. *Pharmacology & therapeutics* 106, 269-297.
- Savineau Jean-Pierre (2007). *New frontiers in smooth muscle biology and physiology.* published by Transworld Research Network. ISBN: 978-7895-295-6.

- Sands, W.A., and Palmer, T.M. (2008). Regulating gene transcription in response to cyclic AMP elevation. *Cellular signalling* 20, 460-466.
- Schett, G., and David, J.P. (2010). The multiple faces of autoimmune-mediated bone loss. *Nature reviews* 6, 698-706.
- Schillace, R.V., and Carr, D.W. (2006). The role of protein kinase A and A-kinase anchoring proteins in modulating T-cell activation: progress and future directions. *Critical reviews in immunology* 26, 113-131.
- Schwartz, M.M. (2007). The pathology of lupus nephritis. *Seminars in nephrology* 27, 22-34.
- Selemidis, S., Dusting, G.J., Peshavariya, H., Kemp-Harper, B.K., and Drummond, G.R. (2007). Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. *Cardiovascular research* 75, 349-358.
- Servillo, G., Della Fazia, M.A., and Sassone-Corsi, P. (2002). Coupling cAMP signaling to transcription in the liver: pivotal role of CREB and CREM. *Experimental cell research* 275, 143-154.
- Sharma RK, Das SB, Lakshmikuttyamma A, Selvakumar P, Shrivastav A. (2006). Regulation of calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1): review. *Int J Mol Med*. 18(1):95-105. ;19(11):1501-1519.
- Sharma, R.K., and Kalra, J. (1994). Characterization of calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase isoenzymes. *The Biochemical journal* 299 (*Pt 1*), 97-100.
- Shattock, M.J. (2009). Phospholemman: its role in normal cardiac physiology and potential as a druggable target in disease. *Current opinion in pharmacology* 9, 160-166.
- Shenoy P, Agarwal V. (2010). Phosphodiesterase inhibitors in the management of autoimmune disease. *Autoimmun Rev*. 9(7):511-5.
- Shimizu, K., Murata, T., Tagawa, T., Takahashi, K., Ishikawa, R., Abe, Y., Hosaka, K., and Kubohara, Y. (2004). Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE1) is a pharmacological target of differentiation-inducing factor-1, an antitumor agent isolated from *Dictyostelium*. *Cancer research* 64, 2568-2571.
- Shoenfeld, Y. (2007). The diversity of autoantibodies to P-ribosomal: the infectious-autoimmunity plot. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 85, 907-909.
- Siuciak, J.A., McCarthy, S.A., Chapin, D.S., Reed, T.M., Vorhees, C.V., and Repaske, D.R. (2007). Behavioral and neurochemical characterization of mice deficient in the phosphodiesterase-1B (PDE1B) enzyme. *Neuropharmacology* 53, 113-124.
- Smith, P.P., and Gordon, C. (2010). Systemic lupus erythematosus: Clinical presentations. *Autoimmunity reviews* 10, 43-45.
- Semerano L, Boissier MC. (2009). Monoclonal antibodies in chronic autoimmune inflammatory diseases. *Med Sci (Paris)*. 25(12):1108-12.

- Smyth A, Oliveira GH, Lahr BD, Bailey KR, Norby SM, Garovic VD. (2010). A systematic review and meta-analysis of pregnancy outcomes in patients with systemic lupus erythematosus and lupus nephritis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 5(11):2060-2068.
- Smith, S.J., Cieslinski, L.B., Newton, R., Donnelly, L.E., Fenwick, P.S., Nicholson, A.G., Barnes, P.J., Barnette, M.S., and Giembycz, M.A. (2004). Discovery of BRL 50481 [3-(N,N-dimethylsulfonamido)-4-methyl-nitrobenzene], a selective inhibitor of phosphodiesterase 7: in vitro studies in human monocytes, lung macrophages, and CD8+ T-lymphocytes. *Molecular pharmacology* 66, 1679-1689.
- Song, L.S., Guatimosim, S., Gomez-Viquez, L., Sobie, E.A., Ziman, A., Hartmann, H., and Lederer, W.J. (2005). Calcium biology of the transverse tubules in heart. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1047, 99-111.
- Sonnenburg, W.K., Rybalkin, S.D., Bornfeldt, K.E., Kwak, K.S., Rybalkina, I.G., and Beavo, J.A. (1998). Identification, quantitation, and cellular localization of PDE1 calmodulin-stimulated cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Methods (San Diego, Calif)* 14, 3-19.
- Souness, J.E., and Rao, S. (1997). Proposal for pharmacologically distinct conformers of PDE4 cyclic AMP phosphodiesterases. *Cellular signalling* 9, 227-236.
- Souness, J.E., Houghton, C., Sardar, N., and Withnall, M.T. (1999). Suppression of anti-CD3-induced interleukin-4 and interleukin-5 release from splenocytes of *Mesocricetus auratus* corticosteroid-infected BALB/c mice by phosphodiesterase 4 inhibitors. *Biochemical pharmacology* 58, 991-999.
- Sousa, L.P., Lopes, F., Silva, D.M., Tavares, L.P., Vieira, A.T., Rezende, B.M., Carmo, A.F., Russo, R.C., Garcia, C.C., Bonjardim, C.A., *et al.* (2010). PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammation by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF- $\kappa$ B-independent manner. *Journal of leukocyte biology* 87, 895-904.
- Springett, G.M., Kawasaki, H., and Spriggs, D.R. (2004). Non-kinase second-messenger signaling: new pathways with new promise. *Bioessays* 26, 730-738.
- Srivani, P., Usharani, D., Jemmis, E.D., and Sastry, G.N. (2008). Subtype selectivity in phosphodiesterase 4 (PDE4): a bottleneck in rational drug design. *Current pharmaceutical design* 14, 3854-3872.
- Stevens, D.R., Seifert, R., Bufe, B., Muller, F., Kremmer, E., Gauss, R., Meyerhof, W., Kaupp, U.B., and Lindemann, B. (2001). Hyperpolarization-activated channels HCN1 and HCN4 mediate responses to sour stimuli. *Nature* 413, 631-635.
- Stephens, N.L., Li, W., Jiang, H., Unruh, H., and Ma, X. (2003). The biophysics of asthmatic airway smooth muscle. *Respiratory physiology & neurobiology* 137, 125-140.
- Sule, S., Fivush, B., Neu, A., and Furth, S. (2010). Increased risk of death in pediatric and adult patients with ESRD secondary to lupus. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*.

- Surapisitchat, J., Jeon, K.I., Yan, C., and Beavo, J.A. (2007). Differential regulation of endothelial cell permeability by cGMP via phosphodiesterases 2 and 3. *Circulation research* 101, 811-818.
- Surks, H.K. (2007). cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation: a tale of two isoforms. *Circulation research* 101, 1078-1080.
- Sutherland, E.W. (1972). Studies on the mechanism of hormone action. *Science* (New York, NY) 177, 401-408.
- Tanaka, T., Ogata, A., and Narazaki, M. (2010). Tocilizumab for the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert review of clinical immunology* 6, 843-854.
- Todorova, L., Bjermer, L., Miller-Larsson, A., and Westergren-Thorsson, G. (2010). Relationship between matrix production by bronchial fibroblasts and lung function and AHR in asthma. *Respiratory medicine* 104, 1799-1808.
- Toubi, E., and Shoenfeld, Y. (2007). Clinical and biological aspects of anti-P-ribosomal protein autoantibodies. *Autoimmunity reviews* 6, 119-125.
- Tournier, J.M., and Birembaut, P. (2010). Nicotinic acetylcholine receptors and predisposition to lung cancer. *Current opinion in oncology*.
- Tortora, G.J., Grabowski, S.R., Imbach, A. et Ferron, A. (2001). *Principes d'anatomie et de physiologie*. Saint-Laurent, Erpi, 1121, [98]. Chapitre : physiologie poumon
- Tsuzaka, K., Nozaki, K., Kumazawa, C., Shiraishi, K., Setoyama, Y., Yoshimoto, K., Abe, T., and Takeuchi, T. (2006). TCRzeta mRNA splice variant forms observed in the peripheral blood T cells from systemic lupus erythematosus patients. *Springer seminars in immunopathology* 28, 185-193.
- Tulic, M.K., and Hamid, Q. (2006). New insights into the pathophysiology of the small airways in asthma. *Clinics in chest medicine* 27, 41-52.
- Ulrik, C.S., and Calverley, P.M. (2010). Roflumilast: clinical benefit in patients suffering from COPD. *The clinical respiratory journal* 4, 197-201.
- Uto, T., Suangkaew, N., Morinaga, O., Kariyazono, H., Oiso, S., and Shoyama, Y. (2010). Eriobotryae folium extract suppresses LPS-induced iNOS and COX-2 expression by inhibition of NF-kappaB and MAPK activation in murine macrophages. *The American journal of Chinese medicine* 38, 985-994.
- Van der Staay, F.J., Rutten, K., Barfacker, L., Devry, J., Erb, C., Heckroth, H., Karthaus, D., Tersteegen, A., van Kampen, M., Blokland, A., et al. (2008). The novel selective PDE9 inhibitor BAY 73-6691 improves learning and memory in rodents. *Neuropharmacology* 55, 908-918.
- Wang, J.H., Sharma, R.K., Huang, C.Y., Chau, V., and Chock, P.B. (1980). On the mechanism of activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase by calmodulin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 356, 190-204.



Wang, Y.J., Jiang, Y.L., Tang, H.F., Zhao, C.Z., and Chen, J.Q. (2010). Zl-n-91, a selective phosphodiesterase 4 inhibitor, suppresses inflammatory response in a COPD-like rat model. *International immunopharmacology* *10*, 252-258.

Webb, R., Kelly, J.A., Somers, E.C., Hughes, T., Kaufman, K.M., Sanchez, E., Nath, S.K., Bruner, G., Alarcon-Riquelme, M.E., Gilkeson, G.S., *et al.* (2010). Early disease onset is predicted by a higher genetic risk for lupus and is associated with a more severe phenotype in lupus patients. *Annals of the rheumatic diseases*.

Wedzicha, J.A., and Donaldson, G.C. (2003). Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Respiratory care* *48*, 1204-1213; discussion 1213-1205.

Welch, E.J., Jones, B.W., and Scott, J.D. (2010). Networking with AKAPs: context-dependent regulation of anchored enzymes. *Molecular interventions* *10*, 86-97.

Westergren-Thorsson, G., Larsen, K., Nihlberg, K., Andersson-Sjoland, A., Hallgren, O., Marko-Varga, G., and Bjermer, L. (2010). Pathological airway remodelling in inflammation. *The clinical respiratory journal* *4 Suppl 1*, 1-8.

Whittington, P.F., Barnes, H.V., and Bayless, T.M. (1977). Medical management of Crohn's disease in adolescence. *Gastroenterology* *72*, 1338-1344.

Yao, H., de Boer, W.I., and Rahman, I. (2008). Targeting lung inflammation: novel therapies for the treatment of COPD. *Current respiratory medicine reviews* *4*, 57-68.

Zhang, H.T. (2009). Cyclic AMP-specific phosphodiesterase-4 as a target for the development of antidepressant drugs. *Current pharmaceutical design* *15*, 1688-1698.

Zhang, H.T., Zhao, Y., Huang, Y., Deng, C., Hopper, A.T., De Vivo, M., Rose, G.M., and O'Donnell, J.M. (2006). Antidepressant-like effects of PDE4 inhibitors mediated by the high-affinity rolipram binding state (HARBS) of the phosphodiesterase-4 enzyme (PDE4) in rats. *Psychopharmacology* *186*, 209-217.

Zhang, Y., Saha, S., Rosenfeld, G., Gonzalez, J., Pepeljugoski, K.P., and Peeva, E. (2010). Raloxifene modulates estrogen-mediated B cell autoreactivity in NZB/W F1 mice. *The Journal of rheumatology* *37*, 1646-1657.

Zhao, Y., Zhang, H.T., and O'Donnell, J.M. (2003). Inhibitor binding to type 4 phosphodiesterase (PDE4) assessed using [<sup>3</sup>H]piclamilast and [<sup>3</sup>H]rolipram. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* *305*, 565-572.

Zielinski, C.E., Jacob, S.N., Bouzahzah, F., Ehrlich, B.E., and Craft, J. (2005). Naive CD4<sup>+</sup> T cells from lupus-prone Fas-intact MRL mice display TCR-mediated hyperproliferation due to intrinsic threshold defects in activation. *J Immunol* *174*, 5100-5109.

Zhou, X., Dong, X.W., Crona, J., Maguire, M., and Priestley, T. (2003). Vinpocetine is a potent blocker of rat NaV1.8 tetrodotoxin-resistant sodium channels. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* *306*, 498-504.



Ziolo, M.T., Lewandowski, S.J., Smith, J.M., Romano, F.D., and Wahler, G.M. (2003). Inhibition of cyclic GMP hydrolysis with zaprinast reduces basal and cyclic AMP-elevated L-type calcium current in guinea-pig ventricular myocytes. *British journal of pharmacology* 138, 986-994.

Zippin, J.H., Chen, Y., Nahirney, P., Kamenetsky, M., Wuttke, M.S., Fischman, D.A., Levin, L.R., and Buck, J. (2003). Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in distinct signaling microdomains. *Faseb J* 17, 82-84.

Zsilak, S., Gal, J., Hodinka, L., Rajczy, K., Balog, A., Sipka, S., Barath, S., Kapitany, A., Zilahi, E., and Szekanecz, Z. (2005). HLA-DR genotypes in familial rheumatoid arthritis: increased frequency of protective and neutral alleles in a multicase family. *The Journal of rheumatology* 32, 2299-2302.

## ANNEXE : FORMULAIRE DE CONSENTEMENT POUR LE PATIENT LUPIQUE



Des gens de soins et d'excellence

**CENTRE HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DE SHERBROOKE**  
Hôpital Fleurimont, 3001, 12e Avenue Nord, Fleurimont (Québec) J1H 5N4  
Hôtel-Dieu, 580, rue Bowen Sud, Sherbrooke (Québec) J1G 2E8  
Téléphone : (819) 346-1110

### FORMULAIRE D'INFORMATION ET DE CONSENTEMENT

TITRE: Rôle des phosphodiésterases spécifiques de l'AMP cyclique dans le lupus érythémateux disséminé (LED) chez l'humain

**Investigateurs : Dr Rousseau Éric et Dr Gilles Boire (CHUS),**

### POUR INFORMATIONS

**Dr Eric Rousseau, investigateur : 819- 564-53-06**

**Dr Gilles Boire, co-investigateur : 819-346-1110, poste 15261**

**Michelle Roy Assistante professionnelle de recherche, (819) 346-1110**

**Poste : 12848**

Nous sollicitons votre participation à un projet de recherche. Cependant, avant d'accepter de participer à ce projet, veuillez prendre le temps de lire, de comprendre et de considérer attentivement les renseignements qui suivent. Nous vous invitons à poser toutes les questions que vous jugerez utiles à l'infirmière responsable du prélèvement et à lui demander de vous expliquer tout mot ou renseignement qui n'est pas clair.

### DESCRIPTION GÉNÉRALE

Ce projet est une collaboration entre le Service de rhumatologie du CHUS et département de physiologie et de biophysique de la Faculté de médecine et sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke. L'objectif du projet est de mieux comprendre l'effet anti-inflammatoire potentiel d'un inhibiteur de phosphodiésterases 4, le NCS 613 sur les cellules sanguines mononuclées (globules blanc avec un seul noyau) de patients atteints de lupus érythémateux disséminé (LED). Les cellules mononuclées du sang se composent en majorité de lymphocytes T et comprennent aussi les monocytes et lymphocytes B. Au cours du LED, les lymphocytes B se mettent à produire de grandes quantités d'anticorps contre des composantes nucléaire; ce qui à long terme risque d'entraîner la destruction de plusieurs organes (rein, cerveau, foie...). Nous savons que le NCS 613 a démontré des effets bénéfiques sur la survie et a retardé la progression de la maladie chez les souris lupiques traitées. Nous pensons que le NCS 613 pourrait réduire la sécrétion d'anticorps auto-immuns et de cytokines pro-inflammatoires qui sont directement impliqués dans les causes de la maladie et dont les conséquences sont la destruction des organes.

Notre étude utilisera cellules sanguines mononuclées (lymphocytes et monocytes) préparés à partir de sang humain provenant de patients atteints de LED. Grâce à un système de culture en laboratoire, ces lymphocytes seront ensuite stimulés pour se multiplier et pour produire des anticorps et des cytokines en présence et en absence de NCS 613. Ces cellules mise en culture dans différentes conditions serviront à préparer des extraits cellulaires. Nous comparerons les propriétés de différents extraits cellulaires, en particulier des marqueurs de l'inflammation et l'expression des phosphodiesterases de type 4. Ces informations pourront nous aider à comprendre l'effet anti-inflammatoire du NCS 613 et le rôle des PDE4 dans la progression du lupus.

### **DÉROULEMENT DE L'ÉTUDE**

Si vous acceptez de participer, vous serez sollicité pour faire un don de sang correspondant à un volume total de 15 ml de sang. Après la désinfection de votre peau, l'infirmière prélèvera votre sang dans des tubes stériles à l'aide d'une aiguille neuve et stérile qui ne servira qu'une seule fois. Vous devrez prévoir environ 30 minutes pour ce prélèvement de sang. Les tubes de sang prélevés seront acheminés au responsable de l'étude au département de physiologie biophysique. Au laboratoire, les cellules mononuclées de votre échantillon de sang seront séparés par gradient de densité par la technique du Ficoll et immédiatement mises en culture. Après multiplication et traitement en culture, les cellules récoltées seront lysées et leurs extraits garder pour une période maximale de 6 mois durant laquelle ces échantillons ne pourront être utilisés que dans le cadre du projet mentionné précédemment. Après cette période, ils seront détruits. Vous serez libre d'accepter ou de refuser unenouvelle demande. Votre sang ne servira pas à des fins commerciales ni pour la transfusion. Aucun test de dépistage de maladies transmissibles ne sera réalisé sur votre sang.

### **BÉNÉFICES**

Vous ne retirez aucun bénéfice personnel en participant à ce projet de recherche. Cependant, nous espérons que les résultats obtenus nous permettront de faire avancer l'état de nos connaissances au sujet de l'effet du NCS 613 dans le traitement des maladies autoimmunes comme le lupus et éventuellement, d'en faire profiter la société.

### **RISQUES ET INCONVÉNIENTS**

À l'exception d'un léger pincement causé par l'aiguille lors de la piqûre, aucune autre sensation désagréable ne devrait être ressentie au cours de ce prélèvement. À l'occasion certaines personnes peuvent se sentir faibles, avoir des nausées durant ou après le prélèvement ou encore ressentir de la douleur ou avoir une ecchymose (un bleu) ou une rougeur au point de ponction. Il est très rare que des donateurs s'évanouissent, aient des spasmes musculaires ou présentent des lésions à un nerf.

### **PARTICIPATION VOLONTAIRE**

Vous êtes libre de participer à cette étude ou de vous en retirer en tout temps sur simple avis verbal. Vous pouvez également demander à ce que votre échantillon de sang, s'il a été conservé, soit détruit. Une lettre confirmant sa destruction vous sera adressée.

## **CONFIDENTIALITÉ**

Durant votre participation à cette étude, le chercheur responsable de l'étude ainsi que son personnel recueilleront et consigneront dans un dossier de recherche les renseignements vous concernant. Seuls les renseignements nécessaires pour répondre aux objectifs scientifiques de ce projet seront recueillis.

Ces renseignements peuvent comprendre les informations contenues dans vos dossiers médicaux concernant votre état de santé passé et présent, vos habitudes de vie ainsi que les résultats de tous les tests, examens et procédures que vous aurez à subir lors de cette étude. Votre dossier peut aussi comprendre d'autres renseignements tels que votre nom, votre sexe, votre date de naissance et votre origine ethnique.

Tous les renseignements recueillis au cours de l'étude demeureront strictement confidentiels dans les limites prévues par la loi. Afin de préserver votre identité et la confidentialité de ces renseignements, vous ne serez identifié que par un numéro de code. La clé du code reliant votre nom à votre dossier de recherche sera conservée par le médecin responsable de l'étude et les infirmières coordonnatrices du CHUS. Les données de recherche seront conservées pendant 5 ans par le chercheur principal

Les données de l'étude ne seront utilisées qu'à des fins de recherche dans le but de répondre aux objectifs scientifiques de l'étude décrits dans ce formulaire d'information et de consentement.

Les données de l'étude pourront être publiées dans des revues médicales ou partagées avec d'autres personnes lors de discussions scientifiques. Aucune publication ou communication scientifique ne renfermera quoi que ce soit qui puisse permettre de vous identifier.

À des fins de surveillance et de contrôle, votre dossier de recherche ainsi que vos dossiers médicaux, s'il y a lieu, pourraient être consultés par une personne mandatée par le Comité d'éthique de la recherche en santé chez l'humain du CHUS ou par des organismes gouvernementaux mandatés par la loi. Toutes ces personnes et ces organismes adhèrent à une stricte politique de confidentialité.

Vous avez le droit de consulter votre dossier de recherche pour vérifier les renseignements recueillis et les faire rectifier au besoin.

## **COMPENSATION**

Aucune compensation financière n'est prévue pour votre déplacement, votre stationnement ou vos repas au CHUS puisque vous y venez dans le cadre d'une visite régulière à votre médecin.

## **Indemnisation**

En signant ce formulaire, vous ne renoncez à aucun de vos droits. Dans l'éventualité où vous seriez victime d'un préjudice causé par ce projet de recherche, vous ne libérez ni l'investigateur, ni l'établissement, de leurs responsabilités légales et/ou professionnelles.

En signant ce formulaire de consentement, vous ne renoncez à aucun de vos droits qui sont protégés par les lois en vigueur au Québec.

### **PERSONNES RESSOURCES**

Si vous avez des questions relatives au déroulement de l'étude, vous pouvez communiquer avec le médecin de l'étude ou l'infirmière de recherche aux numéros de téléphone indiqués sur la première page de ce document. Ce formulaire de consentement et cette étude ont été approuvés par le Comité d'éthique de la recherche en santé chez l'humain du CHUS.

Si vous avez des questions sur votre participation à l'étude vous pouvez communiquer avec le secrétariat du Comité d'éthique au (819) 346-1110, poste 12856 ou 13861. Si vous avez des questions concernant vos droits en tant qu'utilisateur du CHUS, vous pouvez contacter le Commissaire aux plaintes et à la qualité au CHUS au No. (819) 346-1110, poste 14525.

### **CONSENTEMENT À LA RECHERCHE**

*J'ai lu les informations qui précèdent (du présent document). J'ai eu l'occasion de poser des questions et j'ai reçu des réponses satisfaisantes. J'accepte volontairement de participer à l'étude décrite ci-dessus.*

Signature du participant      Nom (caractère d'imprimerie)      Date      Heure

Signature du témoin      Nom (caractère d'imprimerie)      Date      Heure

Signature de la personne      Nom (caractère d'imprimerie)      Date      Heure

qui obtient le consentement      de la personne qui obtient le  
consentement.

### **ENGAGEMENT DU CHERCHEUR QUALIFIE**

Je certifie qu'on a expliqué au sujet de recherche les termes du présent formulaire d'information et de consentement, que le sujet a obtenu réponse aux questions qu'il avait à cet égard et qu'il a été informé qu'il demeure libre de mettre un terme à sa participation, et ce, sans préjudice.

Je m'engage à respecter ce qui a été convenu au formulaire d'information et de consentement et en remettre copie signée au sujet de recherche.

Médecin de l'étude      Nom (caractère d'imprimerie)      Date      Heure

TITRE : Rôle des phosphodiesterases spécifiques de l'AMP cyclique (PDE4) dans le lupus érythémateux disséminé (LED) chez l'Homme

**Investigateurs : Dr Eric Rousseau et Dr Gilles Boire (CHUS).**