

## **Un antituberculeux, la rifampicine : ligand et activateur du récepteur des glucocorticoïdes**

**L**a rifampicine est un produit semi-synthétique dérivé d'un composant naturel la rifamycine, obtenue à partir de cultures de *Streptomyces mediterranei*. Elle est prescrite dans les cas d'infections par le *Staphylococcus* ou *Hemophilus influenzae* et dans les méningites résistantes à la sulfonamide. Cet antibiotique fut introduit en 1972 comme agent antituberculeux : extrêmement efficace contre *M. tuberculosis*, l'activité antibactérienne de la rifampicine est rapide et a permis d'écourter le traitement de 18 à 6 mois [1]. Sa cible est l'ARN polymérase mycobactérienne : elle inhibe l'élongation de l'ARN alors que le début de la transcription n'est pas affecté [2]. Du fait de la recrudescence de la tuberculose, notamment associée à l'apparition dans les années 1980 de l'épidémie VIH (virus de l'immunodéficience humaine), cet antibiotique est de plus en plus utilisé et de plus en plus de patients en subissent les effets secondaires [3]. En effet, la rifampicine, comme les glucocorticoïdes, induit l'expression de cytochromes (CYP) P450 de la sous-famille 3A [4, 5]. Dans le foie et l'intestin, le CYP3A4 est responsable du métabolisme oxydatif de plus de 60 % des médicaments actuellement sur le marché. Ces interactions médicamenteuses avec la rifampicine entraînent des complications cliniques innombrables : l'efficacité atténuée de la chimiothérapie du VIH, par exemple, du fait du métabolisme des inhibiteurs de protéases [6].

La rifampicine a été décrite, en outre, comme un immunomodulateur potentiel, responsable de la réduction de la réponse mitogénique des lymphocytes du sang périphérique [7, 8].

La rapamycine et FK506, des lactones macrocycliques qui présentent des similitudes de structure importantes avec la rifampicine, sont aussi des immunosuppresseurs. Enfin, FK506, comme la dexaméthasone et la rifampicine, module l'expression du cytochrome CYP3A4 [5, 9]. Différents laboratoires ont montré que FK506 et la rapamycine peuvent se lier à l'immunophiline Hsp56, une protéine chaperonne du récepteur glucocorticoïde (GR) [10] et potentialiser la transformation et de la translocation nucléaire de ce récepteur [11]. Mais aucun mécanisme moléculaire d'induction ou de répression de gènes par la rifampicine n'avait été proposé. Les effets expérimentaux et cliniques de la rifampicine sont comparables à ceux observés après traitement par les glucocorticoïdes et la dexaméthasone, un glucocorticoïde synthétique, ou par la rapamycine et FK506 ; tous ces produits activent ou potentialisent la transmission du signal GR, ce qui nous a suggéré que la rifampicine activerait le GR.

L'utilisation clinique majeure des glucocorticoïdes, exploite leur action immunosuppressive et anti-inflammatoire. Ces effets ont été attribués à l'inhibition de la synthèse des interleukines, notamment de l'interleukine-2 (IL-2) qui joue un rôle central dans ces processus. La transmission physiologique du signal des glucocorticoïdes fait intervenir séquentiellement les événements suivants : la liaison de l'hormone sur le site du récepteur (*ligand-binding-domain* LBD) ; la libération des protéines chaperonnes associées au récepteur non actif cytosolique ; la modification conformationnelle et la phosphorylation du récepteur ; la translocation nucléaire ; la fixation du

complexe glucocorticoïde-GR sur une séquence spécifique (GRE) du gène cible, afin d'en moduler l'expression [12-15] (*figure 1*).

### **La rifampicine, un agoniste non stéroïdien du récepteur des glucocorticoïdes**

Nous avons montré que la rifampicine active le récepteur GR en se fixant sur celui-ci [16]. Ce mécanisme moléculaire est impliqué dans l'inhibition de l'expression de l'IL-2 et dans l'induction du CYP3A4 par la rifampicine. La rifampicine, de même que la dexaméthasone, n'induit l'expression d'un gène rapporteur (*luciférase*) contenant les séquences d'association du GR à l'ADN (GRE) que dans les cellules qui expriment le récepteur GR [16] (*figure 2*). Des résultats semblables ont été obtenus après transfection de l'hépatocyte humain en culture primaire, suggérant l'activation du GR endogène. Enfin, l'induction du gène rapporteur en présence du récepteur endogène ou après co-transfection du vecteur d'expression de GR, est inhibée par l'antiglucocorticoïde RU486, suggérant donc une activation du GR par la rifampicine (*figure 2*).

La rifampicine et la rapamycine ont des structures voisines et ont toutes deux été décrites comme des immunomodulateurs potentiels ; cela nous a amenés à rechercher un éventuel rôle potentialisateur du GR par la rifampicine. La rapamycine potentialise l'effet de faibles concentrations de rifampicine ou de dexaméthasone, mais, à l'inverse, l'association rifampicine-dexaméthasone a un effet additif. La rifampicine ne se lie-

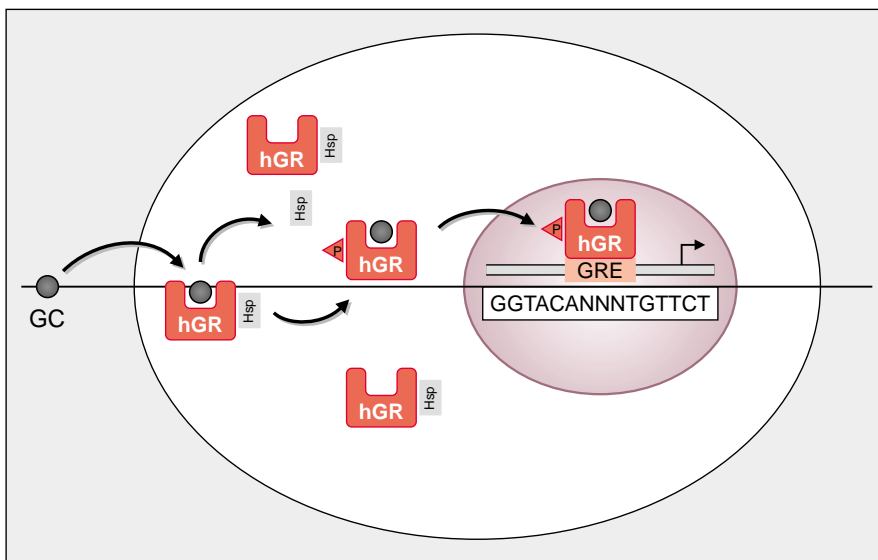


Figure 1. **Mécanisme d'activation du récepteur glucocorticoïde.** La transmission physiologique du signal des glucocorticoïdes (GC) fait intervenir séquentiellement les événements suivants: la liaison de l'hormone au récepteur (hGR); la libération des protéines chaperonnes (Hsp) associées au récepteur non actif cytosolique; la modification conformationnelle et la phosphorylation du récepteur; la translocation nucléaire; la fixation du complexe glucocorticoïde-hGR sur une séquence spécifique (GRE) du promoteur du gène cible afin d'en moduler l'expression.

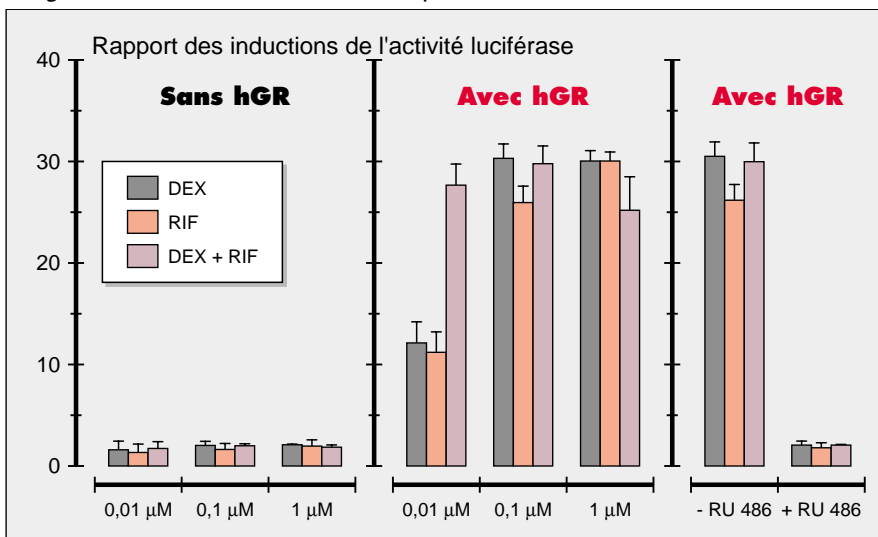


Figure 2. **Activation fonctionnelle du récepteur glucocorticoïde humain par la rifampicine.** Des cellules HepG2 sont transfectées avec le gène rapporteur p(GRE)2-T105-LUC (1 μg), avec ou sans vecteur d'expression hGR (0,1 μg) codant pour le récepteur des glucocorticoïdes hGR. 24 heures après la transfection, les cellules sont traitées par des concentrations croissantes de dexaméthasone (DEX) et/ou de rifampicine (RIF). L'activité luciférase déterminée est normalisée pour une quantité constante de protéine. Par ailleurs, les cellules HepG2 sont traitées par la rifampicine et/ou la dexaméthasone en présence ou en l'absence de 1 μM RU486, l'antagoniste des stéroïdes. RU486 inhibe l'induction de l'activité luciférase par la rifampicine et la dexaméthasone. Le rapport des inductions (activité luciférase des cellules traitées/activité luciférase des cellules non traitées) représente la moyenne ± SD de trois expériences.

rait donc pas à une protéine chaperonne du GR; en revanche, l'effet additif de l'association rifampicine-dexaméthasone à faible concentration indique un vraisemblable mécanisme commun d'activation du récepteur par ces deux molécules.

Nous avons donc cherché à montrer l'existence d'une liaison directe de la rifampicine au récepteur GR, en utilisant divers GR mutés ou délétés, et par des études complémentaires fonctionnelles, biophysiques et de compétition. La rifampicine ne peut activer le récepteur G567C ponctuellement muté sur le domaine de liaison du ligand, pas plus que la dexaméthasone ni l'antagoniste RU486 peuvent se lier à ce récepteur [17, 18]. La rifampicine entre en compétition avec la dexaméthasone radiomarquée pour la fixation sur son récepteur avec une relation dépendante de la dose; ces deux molécules lieraient donc le même site ou des sites très voisins dans le domaine de liaison du récepteur. Cette interprétation a été validée par l'analyse quantitative et directe de la liaison par la technique BIAcore qui permet l'analyse en temps réel, avec une grande sensibilité, des interactions biospécifiques [19, 20]. L'analyse des résultats, a permis de préciser la constante de dissociation pour l'antibiotique ( $K_d = 10 \text{ nM}$ ), de confirmer l'absence de liaison au hGR muté G567C, la compétition de l'association dexaméthasone-hGR par la rifampicine et de l'association rifampicine-hGR par la dexaméthasone. L'ensemble de ces résultats est très en faveur d'une association de l'antibiotique rifampicine au GR, ce qui était inattendu devant les différences de structure et de taille de la dexaméthasone et de la rifampicine. Cependant, l'hydrophobicité et la flexibilité de la molécule de rifampicine devraient lui permettre l'accès à certains des acides aminés définissant la poche de liaison hormonale du récepteur.

#### Vers une approche rationnelle de certains effets secondaires de la rifampicine ?

Le fait que cet antibiotique lie et active le récepteur des glucocorticoïdes humains a des implications

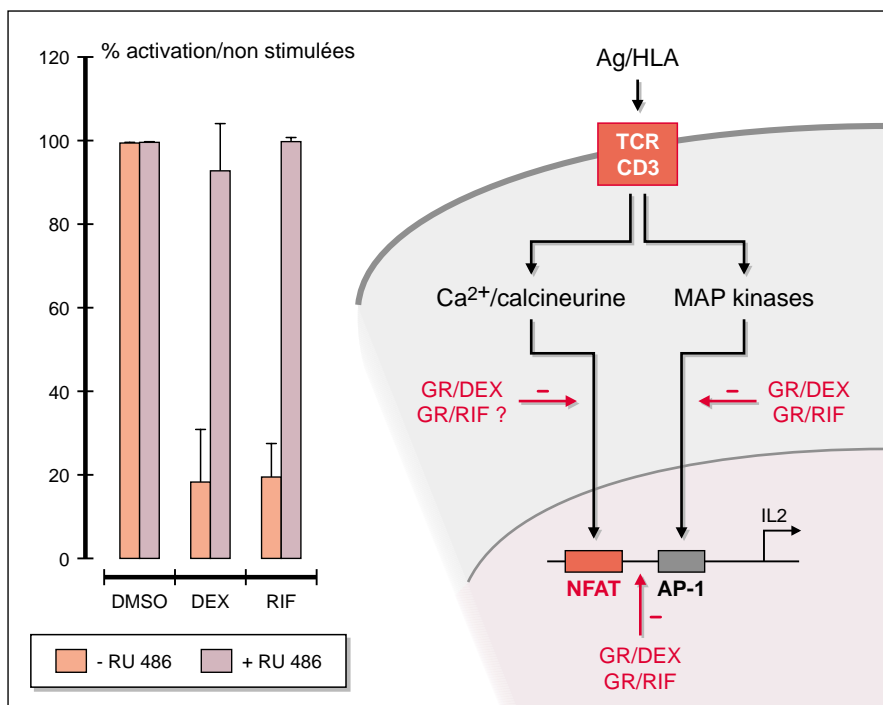


Figure 3. **A. Régulation négative de l'expression du gène IL-2 par la rifampicine.** Des cellules Jurkat, transfectées avec le plasmide pIL-2-350-CAT, sont stimulées par le PMA (ester de phorbol, 100 ng/ml) et l'ionomycine (2  $\mu$ M). Elles sont en outre traitées par 0,1% de diméthyl sulfoxyde (DMSO, solution de solubilisation des inducteurs), ou par la dexaméthasone, ou par la rifampicine (1  $\mu$ M) en absence ou en présence de 10  $\mu$ M RU486 (antagoniste des stéroïdes). L'activité CAT est déterminée 24 heures après et est exprimée en pourcentage de l'activité maximale. La rifampicine, comme la dexaméthasone, inhibent l'activation du gène IL-2. Celle-ci est restaurée par le RU486. Ces résultats sont la moyenne  $\pm$  SD de 3 expériences indépendantes. **B. Mécanismes proposés de l'inhibition de l'IL-2 par les glucocorticoïdes (dans les cellules de Jurkat).** Le traitement par l'ionophore et l'ester de phorbol imite l'activation antigénique, en activant respectivement, d'une part, la voie Ca<sup>2+</sup>/calcineurine (voie activatrice du facteur transcriptionnel NF-AT), d'autre part, la voie des MAP-kinases (voie activatrice du facteur transcriptionnel AP-1). Le récepteur des glucocorticoïdes (GR) activé par la liaison de la dexaméthasone (DEX) ou de la rifampicine (RIF) peut affecter la synergie transactivatrice du gène, soit en abolissant la coopérativité des facteurs transcriptionnels NF-AT et AP-1 nécessaire à l'expression du gène, soit en inhibant l'action de AP-1 par une interaction protéine AP-1/GR activé.

physiologiques importantes : par l'intermédiaire de ce signal de transmission, la rifampicine pourrait moduler l'expression des nombreux gènes qui sont sous le contrôle des glucocorticoïdes, en particulier celui de l'interleukine-2, médiateur central de nombreuses réponses immunitaires et celui du cytochrome P4503A4, hémoprotéine-clé du métabolisme hépatique des médicaments.

En effet, la dexaméthasone, mais aussi la rifampicine, inhibent la synthèse de l'IL-2 par des cellules Jurkat T stimulées, un effet aboli par l'antagoniste RU486, confirmant ainsi l'intervention immunosuppressive du GR (figure 3) ; comment le GR activé peut-il inhiber la transactivation du gène IL-2 ? Il pourrait, soit, par l'association GRE/GR, abolir la coopérativité des facteurs transcriptionnels NF-

AT et AP-1, nécessaire à l'expression génique [21], soit inhiber directement l'action de AP-1 par une interaction protéine AP-1/GR activé [22] (figure 3). Nous avons pu visualiser par deux méthodes associées, immunoprécipitation et immunoblot, la formation du complexe AP-1/GR activé après un traitement par la rifampicine : ces résultats donnent une explication moléculaire à l'effet immunomodulateur de la rifampicine et suggèrent que la reformation du récepteur GR activé par la rifampicine est voisine de celle du récepteur GR activé par la dexaméthasone, ce qui lui permet une association efficace à la protéine AP-1.

La rifampicine induit l'expression du gène CYP3A4 dans le foie humain, ce qui pose un problème important d'interactions médicamenteuses. Nous avons montré que l'induction de l'expression du gène CYP3A4 par la rifampicine était inhibée par l'antagoniste RU486 dans des hépatocytes humains. L'élément du promoteur liant le complexe GR activé-rifampicine a été déterminé après transfection de différentes formes délétées de ce promoteur. Enfin, la séquence d'association du GR a été précisée par mutagenèse dirigée et par l'étude sur gel retard de l'association directe du GR purifié. Toutes ces expériences convergent pour montrer que, dans ce cas encore, la rifampicine active le récepteur GR pour induire l'expression du gène CYP3A4.

## Conclusions et perspectives

Les mécanismes moléculaires bactériens de l'effet antituberculeux de la rifampicine (inhibition de l'élongation de l'ARN polymérase mycobactérienne) et de la résistance à cet effet (apparition de la mutation de la sous-unité  $\beta$  de la polymérase) sont bien connus. En revanche, nous venons de montrer que les effets secondaires de cet antibiotique sont dus à l'activation du récepteur GR humain.

Il reste à définir quelles régions de la molécule de rifampicine sont impliquées dans l'activation du récepteur et lesquelles permettent l'association à l'ARN polymérase, dans le but de fabriquer des analogues de la rifam-

picine à effet antituberculeux (conservation de l'association à l'ARN polymérase) mais sans effets secondaires (perte de l'association au GR). La résolution cristallographique de la structure tridimensionnelle des récepteurs des acides rétinoïques, des hormones thyroïdiennes et, très récemment, du récepteur des œstrogènes, devrait permettre une modélisation par homologie et faciliter la recherche de nouveaux analogues. Le CYP3A4 est inductible par d'autres médicaments et l'on connaît les effets néfastes de cette induction. Par exemple, l'induction du CYP3A4 par le phénobarbital est inhibée par le RU486 dans l'hépatocyte humain, ce qui suggère là encore l'intervention du récepteur GR dans ce mécanisme. Nous étudions d'autres molécules inductibles actuellement sur le marché afin de voir si ce mécanisme est généralisable. Si c'était le cas, nous pourrions proposer un modèle de criblage simple des médicaments avant leur développement ■

## RÉFÉRENCES

- Mitchison DA. The Garrod Lecture. Understanding the chemotherapy of tuberculosis – current problems. *J Antimicrob Chemother* 1992; 29: 477-93.
- Levin ME, Hatfull GF. Mycobacterium smegmatis RNA polymerase: DNA-supercoiling; action of rifampicin and mechanism of rifampicin resistance. *Mol Microbiol* 1992; 8: 277-85.
- Mitchell L, Wendon J, Fitt S, Williams R. Anti-tuberculous therapy and acute liver failure. *Lancet* 1995; 345: 555-6.
- Creteil T, Celier C, Kremers P, Flinois JP, Beaune P, Leroux JP. Induction of drug-metabolizing enzymes by tricyclic antidepressants in human liver: characterization and partial resolution of cytochromes P450. *Br J Clin Pharmacol* 1983; 16: 651-7.
- Pichard L, Fabre I, Daujat M, Domergue J, Joyeux H, Maurel P. Effect of corticosteroids on the expression of cytochromes P450 and on cyclosporin A oxidase activity in primary cultures of human hepatocytes. *Mol Pharmacol* 1992; 41: 1047-55.
- Barry M, Gibbons S, Back D, Mulcany F. Protease inhibitors in patients with HIV disease. Clinical important pharmacokinetic considerations. *Clinical Pharmacokinetics* 1997; 32: 194-209.
- Ibrahim MS, Maged ZA, Haron A, Khalil RY, Attallah AM. Antibiotics and immunity: effect of antibiotics on natural killer, antibody dependent cell-mediated cytotoxicity and antibody production. *Chemioterapia* 1987; 6: 426-30.
- Nessi R, Pallanza R, Fowst G. Rifampicin and immunosuppression. *Arzneim Forsch* 1974; 24: 832-6.
- Corcos L. Phenobarbital and dexamethasone induce expression of cytochrome P450 genes from subfamilies IIB, IIC and IIIA in mouse liver. *Drug Metab Dispos* 1992; 20: 797-801.
- Tai PK, Albers MW, Chang H, Faber LE, Schreiber SL. Association of a 59-kilodalton immunophilin with the glucocorticoid receptor complex. *Science* 1992; 256: 1315-8.
- Ning YM, Sánchez ER. Potentiation of glucocorticoid receptor-mediated gene expression by the immunophilin ligands FK506 and Rapamycin. *J Biol Chem* 1993; 268: 6073-6.
- Yamamoto KR. Steroid receptor regulated transcription of specific gene and gene networks. *Annu Rev Genet* 1985; 19: 209-11.
- Green S, Chambon P. Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation. *Trends Genet* 1988; 4: 309-14.
- Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 1989; 56: 335-9.
- Ringold GM. Steroid-hormone regulation of gene expression. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1985; 25: 529-66.
- Calleja C, Pascucci JM, Mani JC, Maurel P, Vilarem MJ. The antibiotic rifampicin is a nonsteroidal ligand and activator of the human glucocorticoid receptor. *Nat Med* 1998; 4: 92-6.
- Benhamou B, Garcia T, Lerouge T, Vergerac A, Gofflo D, Bigogne C, Chambon P, Gronemeyer H. A single amino acid that determines the sensitivity of progesterone receptors to RU486. *Science* 1992; 256: 206-9.
- Wurtz JM, Bourguet W, Renaud JP, Vivat V, Chambon P, Moras D, Gronemeyer H. A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors. *Nat Struct Biol* 1996; 3: 87-94.
- Fagerstam LG, Karlsson R. Biosensor techniques. In: Van Oss CJ, Van Regenmorte M, eds. *Immunochemistry*. New York: Marcel Dekker Inc, 1993: 949-70.
- Malmqvist M. Biospecific interaction analysis using biosensor technology. *Nature* 1993; 361: 186-7.
- Vacca A, Felli MP, Farina AR, Martinotti S, Maroder M, Screpanti I, Meco D, Petrangeli P, Frati L, Gulino A. Glucocorticoid receptor-mediated suppression of the Interleukin 2 gene expression through impairment of the cooperativity between nuclear factor of activated T cells and AP-1 enhancer elements. *J Exp Med* 1992; 175: 637-46.
- Jonat C, Rahmsdorf HJ, Park KK, Cato ACB, Gebel S, Ponta H, Herrlich P. Antitumor promotion and antiinflammation down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 1990; 62: 1189-204.

### Marie-José Vilarem

Chargée de recherche à l'Inserm. Inserm U. 128, IFR 24, 1919, route de Mende, 34293 Montpellier, France.

### TIRÉS À PART

M.J. Vilarem.



**RETROUVEZ LES REVUES MASSON SUR INTERNET**

**<http://www.masson.fr>  
e-mail : [revues@masson.fr](mailto:revues@masson.fr)**